



**TUGAS AKHIR - SB141503**

## **RESISTENSI DAN POTENSI *Bacillus* SEBAGAI BIOREMOVAL LOGAM KROMIUM (Cr)**

**ADISYA PRIMA NURMALITA SARI  
1511100076**

**Dosen Pembimbing  
Dr. Enny Zulaika, MP**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2015**





FINAL PROJECT- SB141503

## ***Bacillus* RESISTANCE AND POTENTIAL AS CHROMIUM (Cr) BIOREMOVAL**

ADISYA PRIMA NURMALITA SARI  
1511100076

Supervisor  
Dr. Enny Zulaika, MP

BIOLOGY DEPARTMENT  
MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES FACULTY  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2015



LEMBAR PENGESAHAN

**RESISTENSI DAN POTENSI *Bacillus* SEBAGAI  
BIOREMOVAL LOGAM KROMIUM (Cr)**

**TUGAS AKHIR**

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
pada  
Jurusan S-1 Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

**ADISYA PRIMA NURMALITA SARI**  
**NRP. 1511 100 076**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir

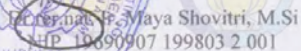
Dr. Enny Zulaika, MP

 (Pembimbing 1)

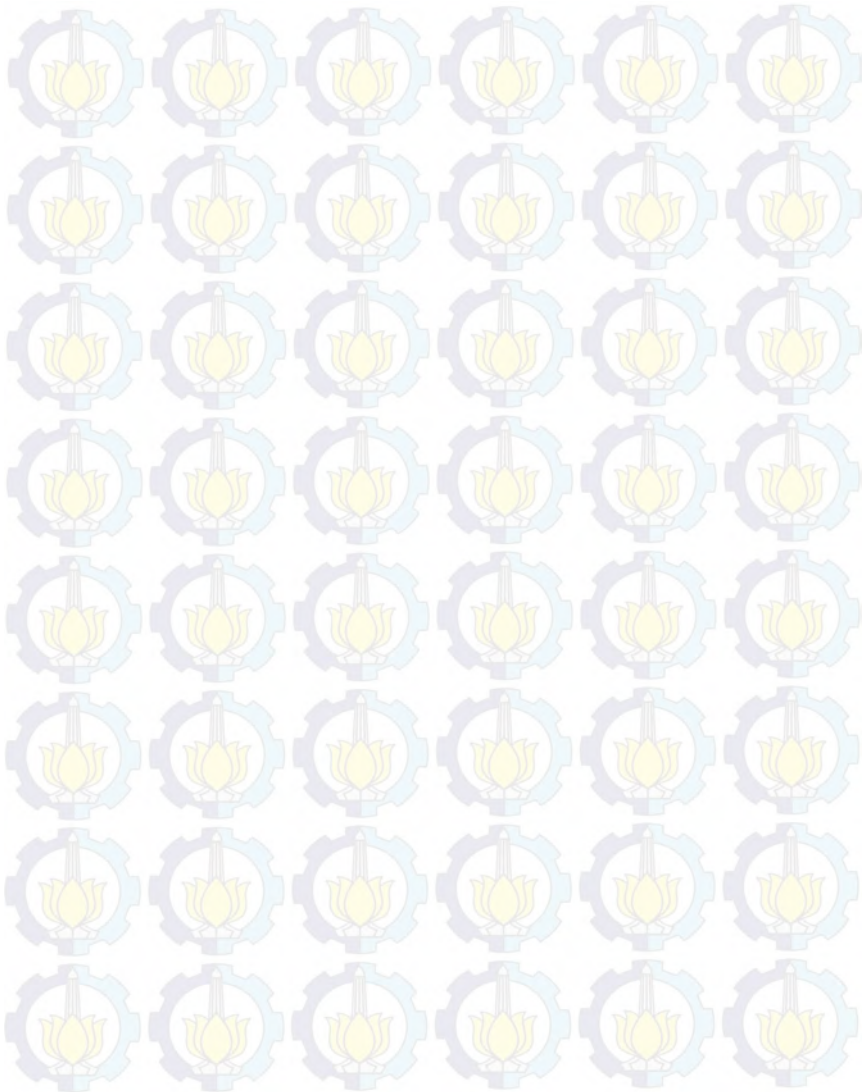
Surabaya, 27 Juli 2015

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



  
Maya Shovitri, M.Si  
NIP. 19690907 199803 2 001

v



## RESISTENSI DAN POTENSI *Bacillus* SEBAGAI BIOREMOVAL LOGAM KROMIUM (Cr)

**Nama Mahasiswa : Adisya Prima Nurmalita Sari**  
**NRP : 1511 100 076**  
**Jurusan : Biologi**  
**Dosen Pembimbing : Dr. Enny Zulaika, MP**

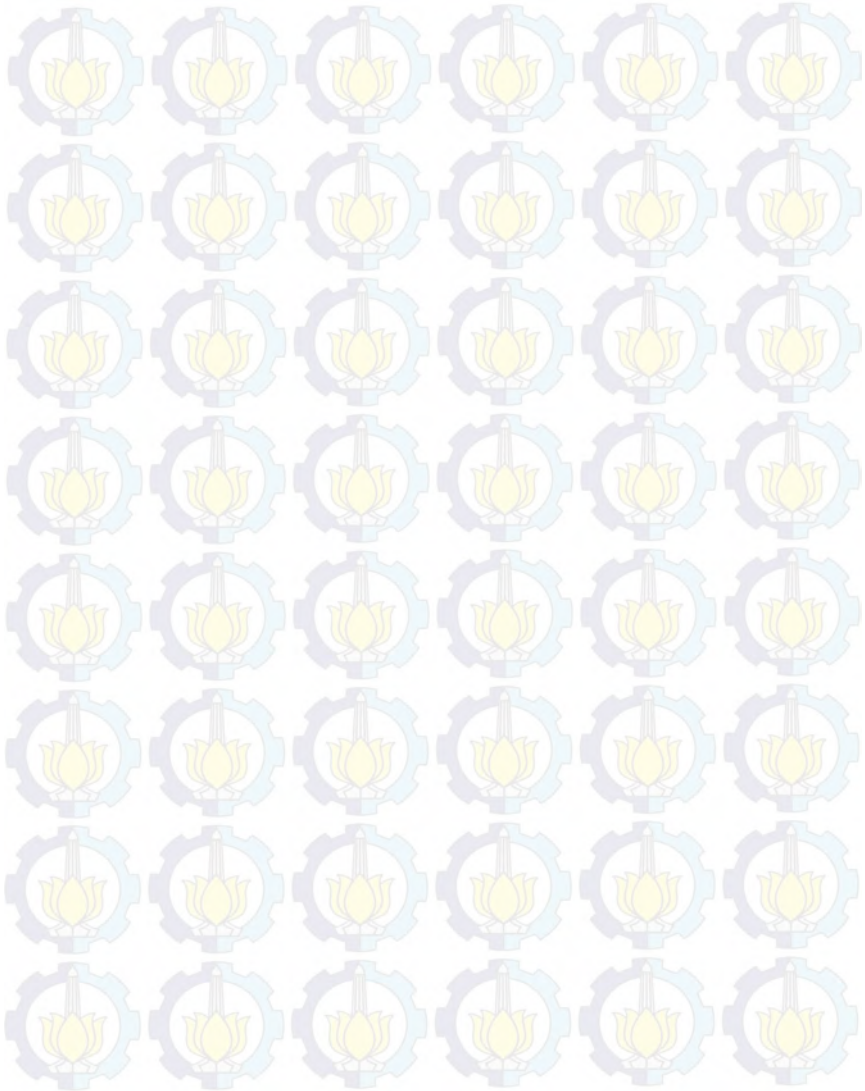
### Abstrak

*Kromium (Cr) tergolong logam berat yang dapat masuk ke lingkungan melalui limbah industri sehingga mencemari lingkungan. Bakteri resisten Cr mampu mengubah Cr(VI) menjadi Cr(III). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui resistensi dan potensi bioremoval kromium oleh Bacillus koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS Surabaya.*

*Penelitian diawali dengan uji resistensi 6 isolat Bacillus untuk mengetahui kemampuan tumbuh isolat pada medium yang mengandung Cr. Dilakukan range finding test untuk mendapatkan konsentrasi logam berat sebagai perlakuan bioremoval dan menentukan 3 isolat terpilih. Kepadatan sel diukur dengan OD menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan divisualisasikan dengan kurva pertumbuhan. Bioremoval Cr diukur dengan metode Atomic Absorption Spectroscopy selanjutnya dilakukan uji viabilitas dengan metode pour plate.*

*Hasil penelitian menunjukkan isolat Bacillus resisten dan viabel terhadap logam Cr pada konsentrasi  $\leq 150$  mg/L. Pola pertumbuhan isolat Bacillus yang tercekam logam Cr relatif lebih rendah dibandingkan yang tidak tercekam Cr. Efisiensi bioremoval Cr yang paling tinggi adalah Bacillus DA11 pada konsentrasi perlakuan 38.8 mg/L, sebesar 76.8%.*

*Kata kunci: Bacillus, bioremoval, Chromium (Cr), resistensi.*





## *Bacillus* RESISTANCE AND POTENTIAL AS CHROMIUM (Cr) BIOREMOVAL

**Student name** : Adisya Prima Nurmalita Sari  
**NRP** : 1511 100 076  
**Department** : Biologi  
**Supervisor** : Dr. Enny Zulaika, M.P.

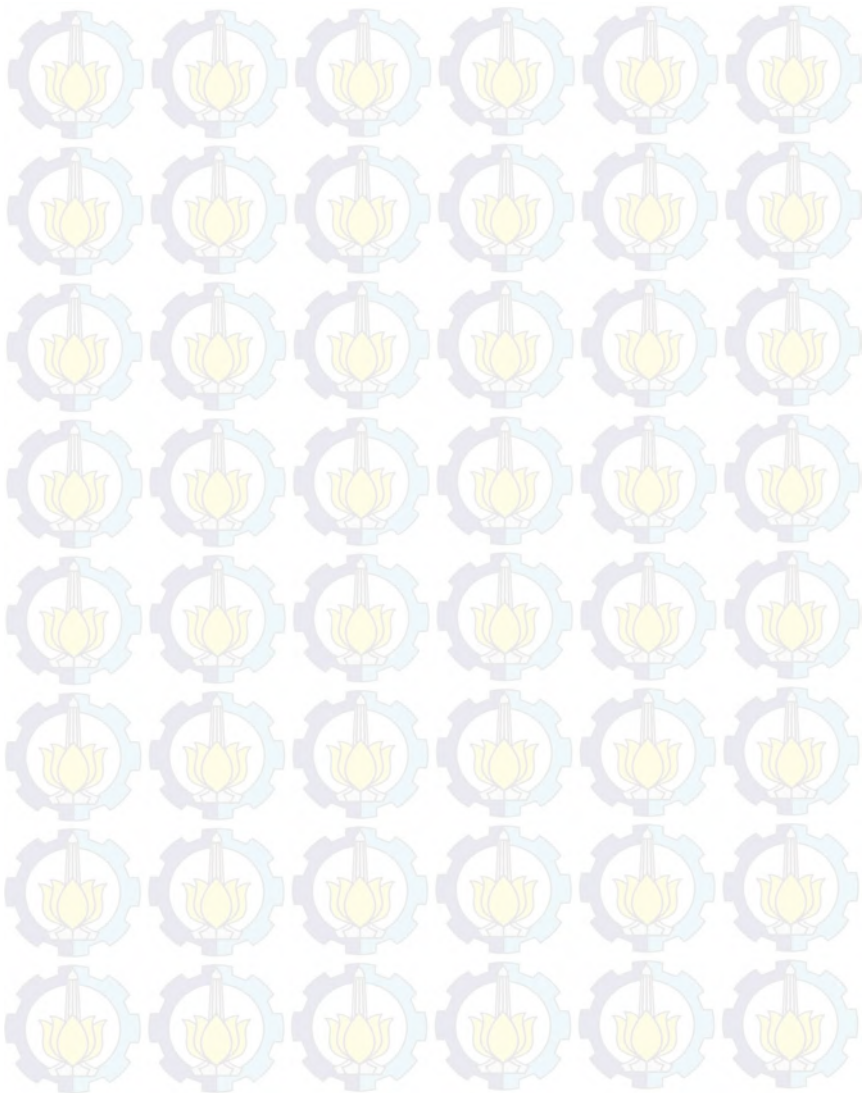
### Abstract

Chromium (Cr) is one of heavy metal that encountered environment from industrial waste so it can contaminate the environment. Chromium resistance bacteria can transform Cr(VI) to Cr(III). The aim of this research is to find out chromium resistance and bioremoval potential of Microbiology and Biotechnology Laboratory's collection *Bacillus* spp.

This research was started with resistance assay of 6 isolates *Bacillus* to determine growth ability of isolates on medium contained Cr. Range finding test were done to determine heavy metal concentration that used in research and determine 3 isolates that more resistance than others. Cell density were measured by OD using spectrophotometer UV-Vis and visualized by growth curve. Chromium bioremoval was measured by Atomic Absorption Spectroscopy method. Viability assay was done by pour plate method.

The result showed that *Bacillus* resistant and viable on media contained chromium at concentration  $\leq 150$  mg/L. Growth pattern of *Bacillus* grown in media contained Cr was relative lower than control. DA11 got highest bioremoval efficiency percentage in the amount of 76.8% at concentration 38.8 mg/L

**Keywords:** *Bacillus*; bioremoval; Chromium (Cr); resistance.



## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, rasa syukur dipanjatkan kehadiran Allah SWT atas karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan Tugas Akhir dengan judul **Resistensi dan Potensi *Bacillus* Sebagai Bioremoval Logam Kromium (Cr)**. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Mei 2015. Penyusunan Tugas Akhir ini merupakan syarat untuk memperoleh gelar sarjana strata 1 (S1) pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

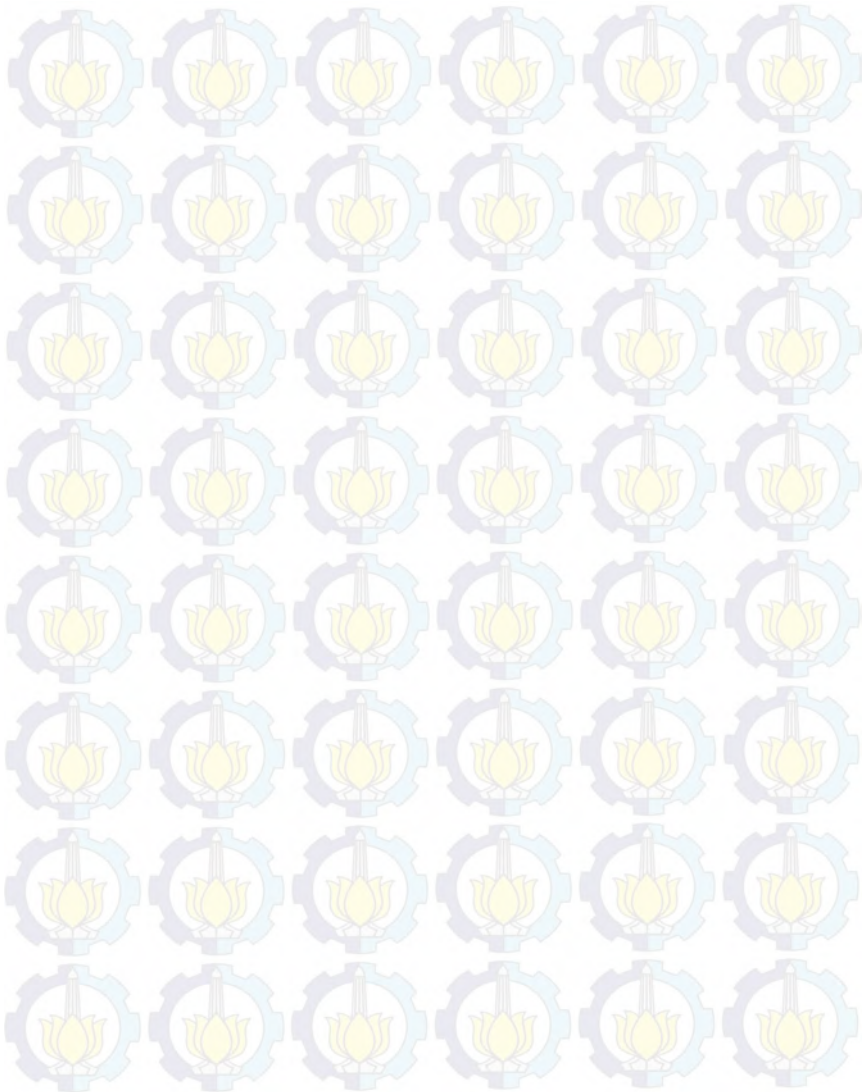
Penelitian ini didukung dengan pendanaan PNPB ITS tahun anggaran 2015 dengan nomor kontrak 003246.IT2.11/PN.08/2015.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Enny Zulaika, M.P. selaku pemimbing serta tim penguji, Aunurrohm, S.Si., DEA dan Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si. Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada Bapak dan Mama, adik-adik serta keluarga atas doa dan semangatnya. Penyusunan Tugas Akhir ini juga tidak lepas dari bantuan dan dukungan teman-teman seperjuangan angkatan 2011 dan seluruh pihak yang telah membantu.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan Tugas Akhir ini, namun besar harapan penulis semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat.

Surabaya, 27 Juli 2015

Adisya Prima Nurmali Sari





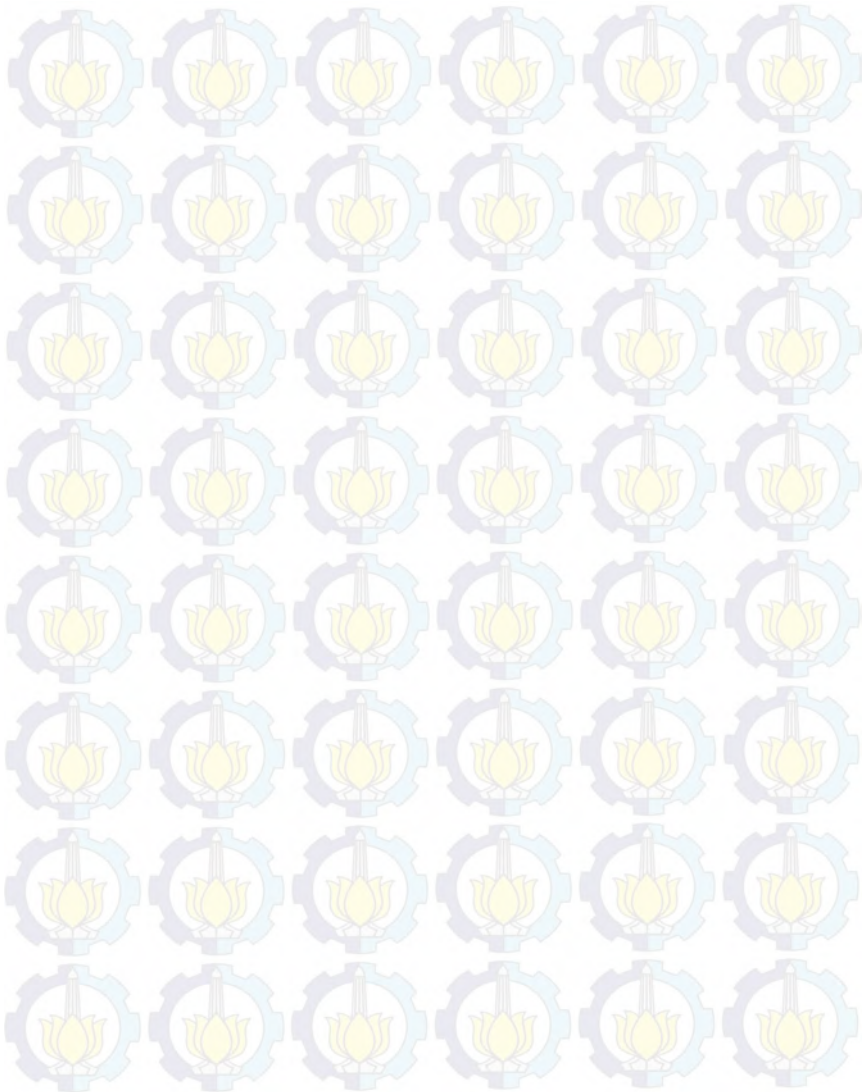
## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	v
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	ix
KATA PENGANTAR .....	xi
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xix
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Permasalahan .....	2
1.3 Batasan Masalah .....	2
1.4 Tujuan .....	3
1.5 Manfaat .....	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kromium (Cr) .....	5
2.2 Toksisitas Kromium .....	5
2.3 Bakteri Resisten Kromium .....	6
2.4 Genera <i>Bacillus</i> .....	8
2.5 <i>Bioremoval</i> Logam Berat .....	9
2.6 Mekanisme <i>Bioremoval</i> Kromium .....	10
 BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	13
3.2 Metode yang Digunakan	
3.2.1 Persiapan dan Subkultur Isolat <i>Bacillus</i> .....	13
3.2.2 Uji Rekonfirmasi Genus <i>Bacillus</i> .....	13
3.2.3 Uji Resistensi <i>Bacillus</i> terhadap Logam Cr .....	14
3.2.4 <i>Range Finding Test Bacillus</i> terhadap Logam Cr ....	14

3.2.5 Uji Viabilitas Isolat <i>Bacillus</i> yang Tercekam Logam Cr .....	14
3.2.6 Penentuan Umur Perlakuan <i>Bioremoval</i> Cr ( $\mu$ jam) pada Isolat <i>Bacillus</i> .....	15
3.2.7 Uji <i>Bioremoval</i> Isolat <i>Bacillus</i> terhadap Logam Cr ..	15
3.2.8 Uji Viabilitas <i>Bacillus</i> .....	16
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data .....	17
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Uji Rekonfirmasi Genus <i>Bacillus</i> .....	19
4.2 Resistensi dan <i>range Finding Test Bacillus</i> terhadap Logam Cr .....	20
4.3 Viabilitas Isolat <i>Bacillus</i> yang Tercekam Logam Cr ...	24
4.4 Penentuan Umur Isolat <i>Bacillus</i> ( $\mu$ jam) untuk Perlakuan <i>Bioremoval</i> .....	27
4.5 Uji <i>Bioremoval</i> Logam Cr .....	29
4.6 Uji Viabilitas <i>Bacillus</i> .....	32
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan .....	35
5.2 Saran .....	35
 DAFTAR PUSTAKA .....	37
LAMPIRAN .....	45

## DAFTAR TABEL

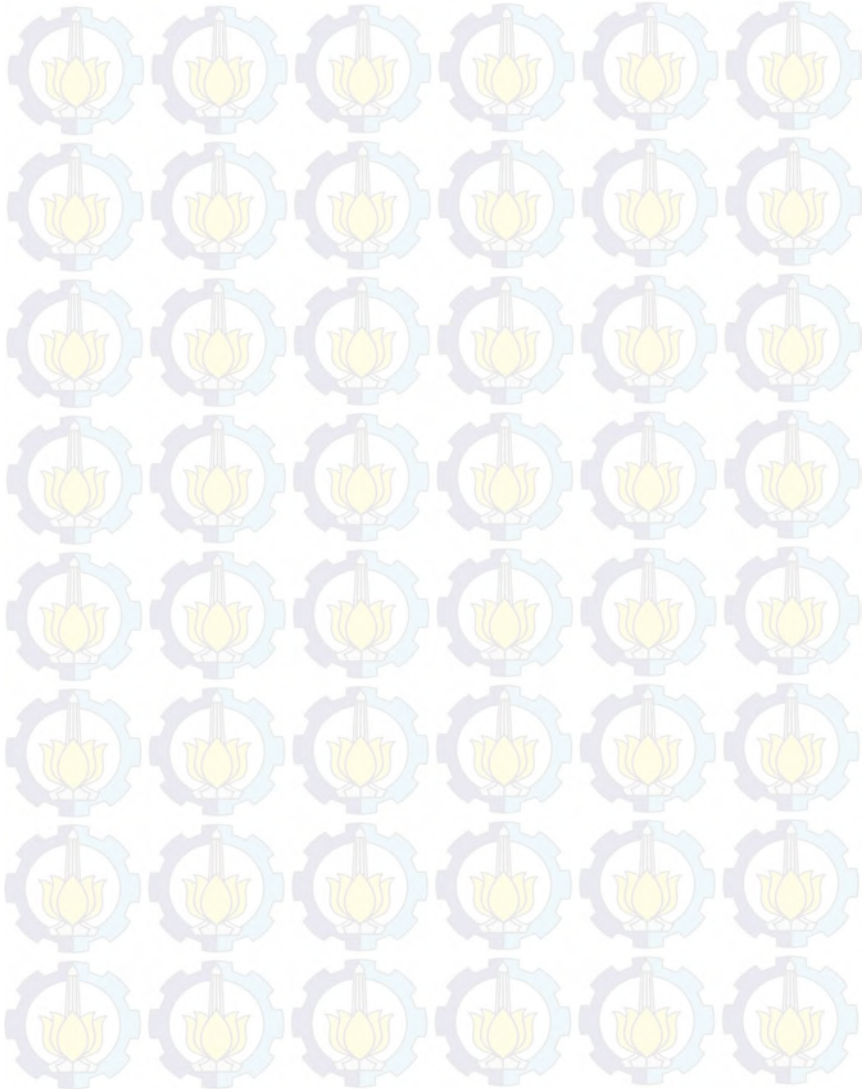
	Halaman
Tabel 4.1 Hasil Uji Rekonfirmasi <i>Bacillus</i> .....	19
Tabel 4.2 Resistensi <i>Bacillus</i> Terhadap $K_2Cr_2O$ .....	21
Tabel 4.3 <i>Bioremoval</i> Logam Cr Oleh <i>Bacillus</i> .....	30
Tabel 4.4 Efisiensi <i>Removal</i> Logam Cr oleh <i>Bacillus</i> .....	31
Tabel 4.5 Hasil Uji Viabilitas Isolat <i>Bacillus</i> .....	33





## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1: Komposisi Medium <i>nutrient agar</i> .....	45
Lampiran 2: Komposisi Medium <i>nutrient broth</i> .....	45
Lampiran 3: Skema Kerja .....	46
Lampiran 4: Skema Kerja Uji Rekonfirmasi .....	47
Lampiran 5: Foto Hasil Uji Rekonfirmasi .....	50
Lampiran 6: Hasil Subkultur Isolat <i>Bacillus</i> .....	55
Lampiran 7: Data Pengukuran OD Isolat <i>Bacillus</i> dalam Media NB .....	56
Lampiran 8: Data Pengukuran OD Isolat <i>Bacillus</i> Tercekam Logam Cr.....	57
Lampiran 9: Perhitungan Umur Perlakuan <i>Bioremoval</i> ( $\mu$ jam) dan Perhitungan Jumlah Sel/ml .....	58
Lampiran 10: Perhitungan Pembuatan Stok Logam Cr 200 mg/L 700 ml .....	59
Lampiran 11: Perhitungan Pembuatan Medium NB- Cr 50 ml untuk <i>Bioremoval</i> .....	59
Lampiran 12: Hasil Uji Bioremoval Logam Cr .....	61



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Logam berat adalah suatu istilah yang digunakan untuk sekelompok logam dan metaloid dengan densitas atom lebih dari  $5\text{g/cm}^3$ , sebagian besar bersifat toksik, tidak dapat didegradasi (Chen, 2012), sehingga selalu ada di lingkungan dalam keadaan persisten (Laxman and More, 2002). Salah satu logam berat yang berbahaya adalah kromium (Cr) (Velasques and Dunsen, 2009), walaupun Cr dalam konsentrasi yang rendah (Nriagu and Nieboer, 1998).

Sebagian besar introduksi kromium ke lingkungan diakibatkan oleh kegiatan antropogenik. Kromium telah banyak digunakan dalam berbagai macam industri, seperti industri penyamakan kulit, *electroplating* (Yun-guo *et al.*, 2008), serta industri cat dan tekstil (Tian-Pei *et al.*, 2014). Penggunaan kromium yang semakin meluas dan tidak diimbangi dengan pengolahan limbah industri yang baik menyebabkan limbah industri yang mengandung kromium akan dilepas begitu saja ke lingkungan (Laxman and More, 2002) sehingga dapat mencemari lingkungan.

Kromium yang banyak dijumpai di alam adalah kromium bervalensi VI (Cr (VI)) dan kromium bervalensi III (Cr (III)). Cr (VI) sangat mudah larut dalam air dan bersifat *mobile* sehingga dapat terakumulasi dalam tubuh manusia melalui rantai makanan. Cr (VI) lebih berbahaya terhadap manusia, hewan, dan lingkungan dibanding Cr (III) karena dapat menyebabkan penyakit kulit atau gangguan saluran pernapasan dan bersifat karsinogenik (Yun-guo *et al.*, 2008).

Beberapa bakteri resisten terhadap kromium, di antaranya *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Deinococcus*, *Shewanella*, *Agrobacterium*, *Escherichia*, dan *Thermus* (Ohtake *et al.*, 1987). Mekanisme resistensi bakteri terhadap logam Cr antara lain melalui mekanisme reduksi Cr (VI) ekstraseluler dan intraseluler,

pengurangan penyerapan melalui jalur sulfat, dan pompa Cr(VI) (Thatoi *et al.*, 2014). Bakteri anggota genus *Bacillus* dapat melakukan *bioremoval* terhadap logam Cr dengan menurunkan valensi dari Cr VI menjadi Cr III sehingga toksisitas logam Cr tersebut menjadi berkurang (Yun-guo *et al.*, 2008).

Merkuri dan kromium adalah logam berat yang bersifat toksik walaupun dalam konsentrasi sangat rendah (Govind and Madhuri, 2014). Isolat *Bacillus* spp. merupakan bakteri yang diisolasi dari Sungai Kalimas Surabaya, telah diketahui merupakan bakteri resisten merkuri (Zulaika *et al.*, 2012), dan secara enzimatik mampu menurunkan kadar merkuri dari media kulturnya (Zulaika and Sembiring, 2014). Selain itu, isolat tersebut juga diketahui resisten terhadap logam Hg, Cd, Pb, dan Cu (Zulaika dkk, 2012). Isolat *Bacillus* spp. belum diketahui resistensi dan kemampuan *bioremoval*-nya terhadap logam Cr sehingga diharapkan isolat *Bacillus* spp. juga resisten terhadap kromium dan mampu melakukan *bioremoval* terhadap kromium.

## 1.2 Permasalahan

Rumusan permasalahan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah semua isolat *Bacillus* resisten terhadap logam berat kromium?
2. Jika resisten, bagaimana potensi isolat tersebut dalam *removal* logam Cr?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Isolat yang digunakan untuk uji resistensi adalah isolat *Bacillus* spp. yang diisolasi dari Kalimas Surabaya dengan kode isolat A6, S1, S6, SS19, dan DA11.
2. Kromium yang digunakan adalah senyawa potasium dikromat ( $K_2Cr_4O_7$ ) yang merupakan salah satu bentuk Cr valensi VI.



3. Konsentrasi Cr VI dianalisis dengan AAS (*Atomic Absorption Spectroscopy*) dengan panjang gelombang ( $\chi$ ) = 357.9 nm (Monteiro *et al.*, 2002).
4. Konsentrasi Cr yang digunakan adalah sesuai dengan *range finding test*.

#### **1.4 Tujuan**

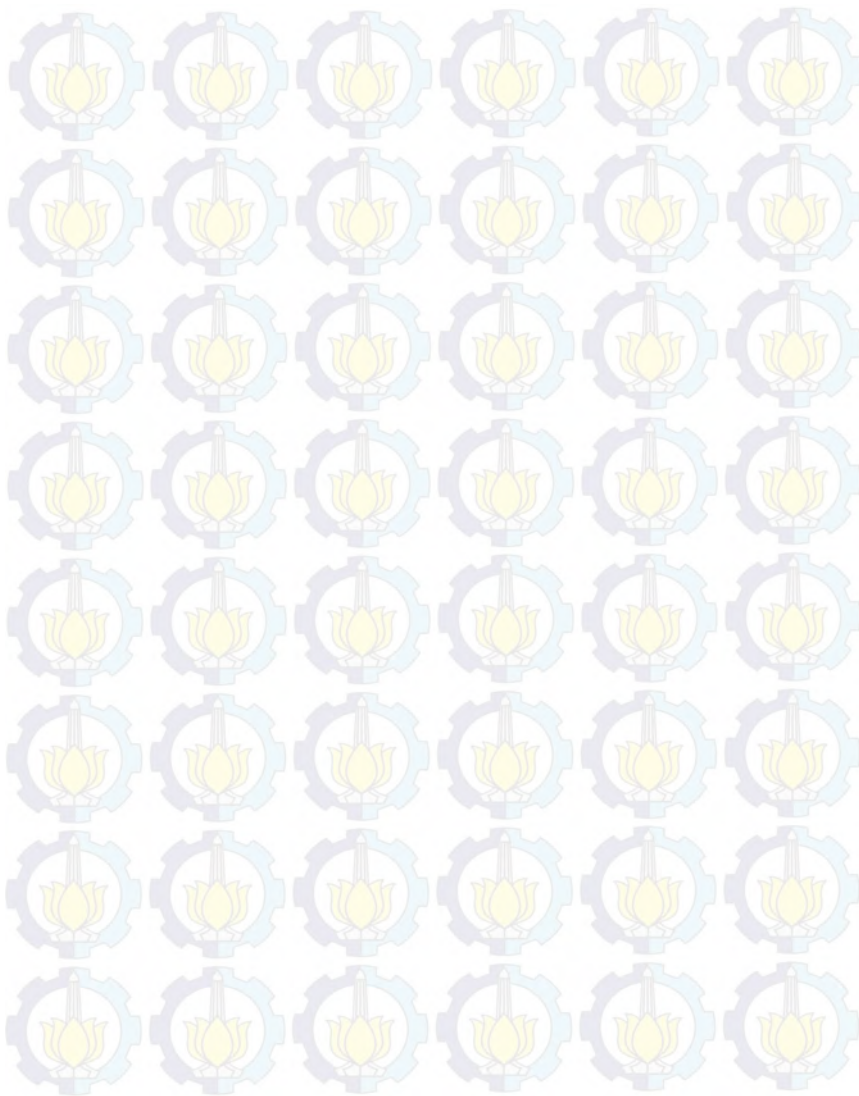
Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mendapatkan isolat *Bacillus* yang resisten terhadap Cr.
2. Mengetahui kemampuan *Bacillus* dalam melakukan *bioremoval* terhadap logam Cr.

#### **1.5 Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan mendapat isolat *Bacillus* yang dapat dimanfaatkan sebagai agen *bioremoval* logam Cr dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen bioremediasi lahan tercemar Cr yang ramah lingkungan.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Kromium (Cr)**

Kromium (Cr) merupakan suatu unsur yang tergolong dalam logam transisi golongan VIB. Unsur ini memiliki nomor atom 24 dengan massa atom sebesar 52. Dalam tabel periodik, unsur ini berada pada urutan ke-24. Kromium mudah bereaksi dengan unsur lain membentuk suatu senyawa baru karena adanya dua elektron di kulit terluarnya. Kromium murni tidak dapat bereaksi dengan unsur lain secara kimiawi. Hal ini menyebabkan kromium menjadi tahan terhadap korosi. Secara fisik, unsur ini merupakan logam berwarna keabu-abuan yang terlihat mengkilap ketika digosok (Lepora, 2005).

Kromium jarang ditemukan dalam bentuk murni di alam. Kebanyakan kromium ditemukan dalam bentuk mineral berupa kromit (*chromite*) (Roza, 2013). Kromium tersedia di alam dalam beberapa bilangan oksidasi, akan tetapi tidak semua dari bilangan oksidasi tersebut memiliki kestabilan yang sama. Bilangan oksidasi kromium terdapat dalam rentang  $\text{Cr}^{6+}$  (Cr(VI)) hingga  $\text{Cr}^0$  (Nriagu and Nieboer, 1988).

Bilangan oksidasi yang banyak ditemukan di alam adalah Cr(III) dan Cr(VI). Menurut Gomez and Callao *dalam* Ahmad *et al.* (2009), Cr(III) dan Cr(VI) ada di lingkungan sebagai hasil dari pelepasan limbah. Kromium menjadi fokus perhatian pada industri dan lingkungan karena unsur ini tidak dapat didegradasi secara alami. Cr(VI) lebih toksik dibanding Cr(III) sehingga dapat membentuk senyawa lain yang berbahaya.

#### **2.2 Toksisitas Kromium**

Penelitian mengenai bahaya kromium telah banyak dilakukan sejak seabad yang lalu. Paparan beberapa senyawa kromium dapat menyebabkan asma, kanker paru-paru, luka pada rongga hidung dan kulit, dan alergi pada kulit (Katz and Salem,

1994). Kromat dalam bentuk anion sangat mudah larut dalam air dan dapat menghambat permeabilitas seluler (Thacker *et al.*, 2006). Logam berat oxianion ikut dalam jalur metabolisme yang secara struktural tidak membutuhkan adanya logam berat dalam jalur tersebut, sehingga mengganggu jalur metabolisme (Srivastava and Thakur, 2006).

Cr(VI) atau *hexavalent chromium* merupakan salah satu bentuk kromium yang paling berbahaya. Menurut Yun-guo *et al.* (2008), Cr(VI) dan senyawa yang mengandung Cr(VI) sangat mudah larut dalam air dan bersifat *mobile* sehingga dapat terakumulasi dalam tubuh manusia melalui rantai makanan. Cr(VI) telah dikategorikan sebagai logam berat paling berbahaya karena dapat menyebabkan penyakit kulit dan saluran pernapasan melalui kontak langsung dan bersifat karsinogenik.

### 2.3 Bakteri Resisten Kromium

Dhal *et al.* dalam Thatoi *et al.* (2014) menyebutkan untuk kepentingan bioremediasi, digunakan bakteri yang memiliki kemampuan resistensi terhadap kromium dan kemampuan mereduksi Cr(VI) menjadi Cr(III), mengingat Cr(III) merupakan bentuk kromium yang lebih stabil di lingkungan. Coleman *et al.* dalam Thatoi *et al.* (2014) mengatakan mikroorganisme yang memiliki kemampuan mereduksi Cr(VI) disebut bakteri pereduksi kromium (*chromium reducing bacteria* / CRB), seperti *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Deinococcus*, *Shewanella*, *Agrobacterium*, *Escherichia*, dan *Thermus* (Ohtake *et al.*, 1987). Menurut Thatoi *et al.* (2014), terdapat empat mekanisme resistensi Cr(VI) pada bakteri, antara lain:

1. **Pengurangan penyerapan Cr(VI)**, mekanisme ini terkait dengan jalur penyerapan sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), Cr(VI) akan masuk ke dalam membran sel melalui jalur penyerapan sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) karena kromat memiliki struktur yang sama dengan sulfat sehingga Cr(VI) dapat dengan mudah masuk ke dalam membran sel (Wenbo *et al.*, 2000).



2. **Reduksi Cr(VI) ekstraseluler**, Cr(VI) direduksi di luar membran sel menjadi Cr(III) akibat reaksi dengan gugus fungsional di permukaan sel bakteri (Ngwenya and Chirwa, 2011), seperti karboksil, amin, hidroksil, fosfat, sulfhidril (Parmar *et al.*, 2000), yang kemudian Cr(III) diikat oleh peptidoglikan pada dinding sel bakteri (Hoyle and Beveridge, 1983). Adanya reduksi ekstraseluler Cr(VI) dan pengikatan Cr(III) oleh peptidoglikan sehingga tidak adanya Cr(VI) yang masuk ke dalam sel (Thathoi *et al.*, 2014).
3. **Reduksi Cr(VI) intraseluler**, mekanisme ini terjadi setelah Cr(VI) masuk ke dalam sel bakteri. Di dalam sel, Cr(VI) direduksi menjadi Cr(III) dengan membentuk unsur intermediet, Cr(V), yang dioksidasi kembali menjadi Cr(VI). Proses ini menyebabkan terbentuknya ROS (*reactive oxygen species*), yang berakibat terjadinya tekanan oksidatif dalam sel (Ramirez-Diaz *et al.*, 2008).
4. **Pompa Cr(VI) dari dalam sel**, adanya pompa ion kromat pada sitoplasma sel dapat mencegah akumulasi ion toksik dalam sel bakteri. Pompa ion tersebut adalah protein ChrA, yang berfungsi sebagai pompa yang mengeluarkan kromat dari sitoplasma atau periplasma keluar sel (Ramirez-Diaz *et al.*, 2008).

Penelitian mengenai bakteri resisten kromium telah banyak dilakukan. Viti *et al.* (2009) menyatakan bahwa *Pseudomonas corrugate* 28 merupakan bakteri yang tingkat resistensi terhadap kromiumnya sangat tinggi. Adanya gen *oscA* yang disisipkan dalam bakteri tersebut menyebabkan *Pseudomonas corrugata* 28 resisten terhadap Cr(VI). Ahmad *et al.* (2009) melakukan penelitian mengenai *Acinetobacter haemolyticus* yang diisolasi dari limbah tekstil yang mengandung Cr(VI), yang mana bakteri ini resisten terhadap Cr(VI) hingga konsentrasi 30 dan 90 ppm dalam medium padat dan cair LB (Luria Bertani). *Bacillus sphaericus* yang diisolasi dari suatu wilayah di Chidyatapu and Rutland Island of Andaman, India, juga dilaporkan resisten

terhadap kromium hingga konsentrasi 800 ppm dan mampu mereduksi >80% Cr(VI) selama masa pertumbuhannya. Reduksi Cr(VI) tersebut menggunakan glukosa dan *yeast extract* sebagai elektron donor (Pal and Paul, 2004). *Bacillus cereus* SJ1 dan *Bacillus thuringiensis* strain 92 – 97 diketahui resisten terhadap Cr(VI). Mekanisme resistensi *Bacillus cereus* SJ1 dan *Bacillus thuringiensis* strain 92 – 97 diduga diatur oleh operon *chlra1* dan gen *chrA* diduga merupakan transpoter Cr(VI). Operon *chlra1* dan gen *chrA* telah diketahui merupakan *inducible genes* (He *et al.*, 2010).

## 2.4 Genera *Bacillus*

Genus *Bacillus* merupakan genera bakteri yang berbentuk batang lurus dengan ukuran 0.5 – 2.5 x 1.2 – 10 µm dan sering tersusun berpasangan atau membentuk rantai dengan ujung kotak atau membulat. Genus *Bacillus* termasuk bakteri Gram positif, bersifat motil dengan flagella peritrik, memiliki satu endospora tiap sel dan sangat resisten terhadap banyak kondisi lingkungan yang kurang baik. Genera *Bacillus* bersifat aerob atau anaerob fakultatif, katalase positif, mampu tumbuh pada medium yang mengandung NaCl 5%, memiliki kemampuan fisiologis yang luas dengan faktor lingkungan seperti pH, temperatur, dan salinitas. Merupakan bakteri kemoautotrof yang mampu hidup secara fermentatif maupun respiratif (Holt *et al.*, 1994).

*Bacillus* diketahui resisten terhadap berbagai macam logam berat. Zulaika dkk. (2011) menyebutkan bahwa *Bacillus* yang diisolasi dari Kalimas Surabaya resisten terhadap merkuri (Hg). *Bacillus* S1, SA1, SS19, dan D11 diketahui resisten terhadap logam Pb, Cd, dan Cu (Arinda *et al.*, 2012). Adanya eksopolisakarida (EPS) memungkinkan terikatnya logam pada permukaan sel mikroorganisme (Vijayarghavan and Yun, 2008).

## 2.5 Bioremoval Logam Berat

*Bioremoval* merupakan suatu proses menghilangkan kontaminan yang terlarut dalam suatu larutan yang berupa logam berat menggunakan potensi metabolit suatu mikroorganisme untuk menghilangkan logam berat tersebut. Dalam menghilangkan logam berat yang mencemari suatu area, dapat digunakan mikroorganisme, seperti bakteri atau mikroalga dan sianobakteria. Mekanisme yang digunakan dalam proses *bioremoval* adalah biosorpsi dan bioakumulasi (Focardi *et al.*, 2013).

Biosorpsi logam berat merupakan suatu proses penyerapan logam berat oleh sorben yang berupa material biologis dalam suatu solven tertentu. Material biologis memiliki afinitas (kecenderungan suatu unsur atau senyawa untuk membentuk suatu ikatan kimia dengan unsur atau senyawa lain) yang lebih tinggi dibanding logam berat, sehingga logam berat tertarik ke material biologis dan dihilangkan dengan mekanisme tertentu. (Das *et al.*, 2008). Lebih jelas lagi, Zabochnicka-Swiatek and Krzywonos (2014) menjelaskan bahwa biosorpsi merupakan suatu proses fisika-kimia pengikatan ion logam (berbentuk kation) oleh membran sel makhluk hidup, khususnya mikroorganisme, yang mana pada membran sel terdapat senyawa bermuatan negatif, melalui mekanisme tertentu, seperti melalui pertukaran ion atau pembentukan kompleks logam-gugus fungsional membran sel. Biosorpsi memungkinkan penggunaan sel yang dimatikan (*dead cells*) untuk mengikat logam berat.

Bioakumulasi merupakan suatu proses pengikatan logam atau senyawa organik yang toksik di dalam sel. Metabolisme mikroorganisme bioakumulator menjadi hal yang penting dalam proses bioakumulasi. Logam berat toksik masuk ke dalam sel dengan membentuk kompleks logam-membran sel, seperti pada biosorpsi, kemudian logam berat toksik masuk ke dalam sel melalui jalur transport aktif (Chojnacka, 2010). Pada proses bioakumulasi sel menyerap ion logam, kemudian logam masuk ke

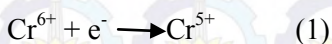


dalam sel melalui jalur yang sama dengan jalur masuk nutrisi yang dibutuhkan sel mikroorganisme (Zabochnicka-Swiatek and Krzywonos, 2014).

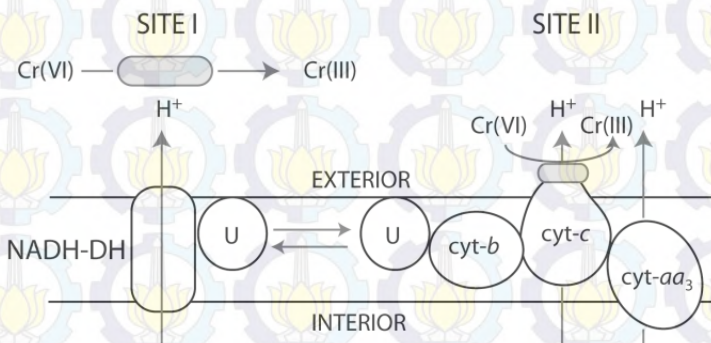
## 2.6 Mekanisme *Bioremoval* Kromium

Mikroorganisme dapat *meremove* suatu jenis logam di lingkungan atau aliran limbah dengan cara mereduksi bilangan oksidasi logam tersebut menjadi lebih rendah (Lovely *dalam* Thatoi *et al.*, 2014). Senyawa toksik, khususnya logam berat, cenderung melalui jalur reduksi dibanding oksidasi, mengingat logam dalam bentuk tereduksi secara umum bersifat lebih tidak toksik. Suatu logam yang memiliki bilangan oksidasi lebih tinggi biasanya lebih toksik dibandingkan logam dengan bilangan oksidasi yang lebih rendah (Thatoi *et al.*, 2014).

*Removal* atau degradasi Cr dapat dilakukan secara aerobik maupun anaerobik (EPA *dalam* Thatoi *et al.*, 2014). *Bacillus* merupakan salah satu mikroba yang dapat mendegradasi Cr(VI) menjadi Cr(III) (Chirwa and Molokwane, 2011). Degradasi Cr yang dilakukan oleh *Bacillus* terjadi secara aerobik (Ohtake *dalam* Thathoi *et al.*, 2014). Proses ini membutuhkan oksigen (O<sub>2</sub>) sebagai elektron aseptor (EPA *dalam* Thathoi *et al.*, 2014) dan NAD(P)H sebagai elektron donor, dengan melibatkan NADH-dehidrogenase yang terletak di periplasma (Chirwa and Molokwane, 2011). Cr(VI) menerima tiga elektron dari NADH sehingga Cr(VI) berubah menjadi Cr(III), yang terjadi dalam dua tahap. Cr(VI) menerima satu elektron dari molekul NADH sehingga terbentuk Cr(V), kemudian Cr(V) menerima dua elektron sehingga terbentuk Cr(III) (Singh *et al. dalam* Thatoi *et al.*, 2014). Berikut ini adalah reaksi degradasi Cr(VI) menjadi Cr(III).



Cr(III) yang telah terbentuk selanjutnya akan terikat ke gugus fungsional bermuatan negatif yang ada pada membran sel. Cr(III) juga dapat membentuk kompleks dengan membran sel dan kapsul eksopolimer yang dapat menghambat masuknya Cr(III) ke dalam sitoplasma (McLean and Beveridge *dalam* Thatoi *et al.*, 2014).

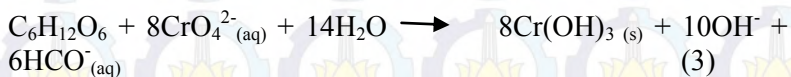
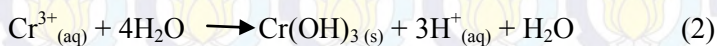
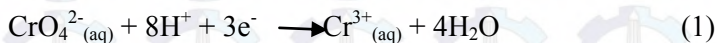


Gambar 2.1 Mekanisme Degradasi Logam Cr (Chriwa and Molokwane, 2011)

Keterangan: Site I: Degradasi secara aerobik; Site II: degradasi secara anaerobik; NADH-DH: NADH-dehidrogenase; U: ubiquinone; cyt-b: sitokrom b; cyt-c: sitokrom c; cyt-aa<sub>3</sub>: sitokrom aa<sub>3</sub>

*Removal* atau degradasi Cr juga dapat terjadi secara anaerobik, yang menggunakan Cr(VI) sebagai elektron aseptor terakhir dan melibatkan enzim reduktase atau protein yang berada di membran (*membrane bound reductase*), seperti flavin reduktase, sitokrom, dan hidrogenase yang merupakan salah satu penyusun sistem transpor elektron (Thatoi *et al.*, 2014). Karbohidrat, protein, lemak, hidrogen (H<sub>2</sub>), dan NAD(P)H dapat bertindak sebagai elektron donor (Singh *et al. dalam* Thatoi *et al.*, 2014). Elektron yang berasal dari elektron donor akan melalui beberapa sitokrom, seperti sitokrom b, sitokrom c, dan sitokrom aa<sub>3</sub>. Kemudian elektron tersebut akan diterima oleh elektron

aseptor terakhir, yaitu Cr(VI), sehingga Cr(VI) akan tereduksi menjadi Cr(III) (Thatoi *et al.*, 2014). Cr(III) selanjutnya mengalami presipitasi menjadi Cr(OH)<sub>3</sub> (Singh *et al. dalam* Thatoi *et al.*, 2014). Berikut ini adalah reaksi reduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) dengan glukosa sebagai elektron donor.





## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Januari hingga Mei 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

### **3.2 Metode yang Digunakan**

#### **3.2.1 Persiapan dan Subkultur Isolat *Bacillus***

Persiapan dilakukan dengan subkultur isolat *Bacillus* dengan tujuan meremajakan isolat yang akan diuji sehingga isolat dalam kondisi optimal ketika dilakukan pengujian. Isolat uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus* koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS Surabaya dengan kode isolat A6, S1, S6, SS19, DA11 dan *Bacillus cereus* ATCC 1178 sebagai kontrol. Subkultur isolat *Bacillus* dilakukan dengan menggunakan medium *nutrient agar* (NA) yang telah disterilisasi dengan autoklaf bertekanan 1,5 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Isolat diambil sebanyak satu ose, kemudian digores dengan metode *continue streak slant* pada medium miring NA dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Keberhasilan subkultur ditandai dengan tumbuhnya isolat pada medium miring NA.

#### **3.2.2 Uji Rekonfirmasi Genus *Bacillus***

Uji rekonfirmasi masing-masing isolat *Bacillus* A6, S1, S6, SS19, dan DA11 sesuai karakter kunci untuk genus *Bacillus* menggunakan panduan *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*. Selanjutnya dilakukan *generic assignment* dan *profile matching* sesuai karakter kunci genus *Bacillus* (Holt *et al*, 1994).

### 3.2.3 Uji Resistensi *Bacillus* Terhadap Logam Cr

Resistensi *Bacillus* terhadap logam Cr diuji untuk mengetahui apakah isolat uji mampu resisten ketika dipapar logam Cr atau tidak. Uji resistensi dilakukan dengan menumbuhkan isolat *Bacillus* umur 24 jam pada media NA-K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> dengan metode *continue streak plate* secara aseptis. Media NA-K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> mengandung 0.1 mg/L K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Kultur diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang. Koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

### 3.2.4 Range Finding Test *Bacillus* Terhadap Logam Cr

Pengujian *range finding test* dilakukan untuk mengetahui konsentrasi logam Cr yang dapat ditoleransi oleh *Bacillus* spp. secara optimal. Isolat ditumbuhkan secara aseptis pada media NA yang mengandung K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> dengan konsentrasi mulai 5, 10, 20, 30, hingga konsentrasi maksimal (mg/L) yang mampu ditoleransi isolat. Kultur diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang. Isolat yang tumbuh adalah isolat yang resisten terhadap logam Cr. Dipilih 3 isolat yang memiliki kemampuan resistensi terhadap logam Cr yang lebih baik dibanding isolat lain. Konsentrasi yang akan digunakan dalam uji *bioremoval* adalah konsentrasi yang berada 3 level di bawah konsentrasi maksimal dan dapat ditoleransi oleh isolat uji, misal X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, dan X<sub>3</sub> ppm.

### 3.2.5 Uji Viabilitas Isolat *Bacillus* yang Tercekam Logam Cr

Uji viabilitas isolat *Bacillus* ditentukan dengan mengamati kurva pertumbuhan isolat dalam medium NB-Cr. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan membuat *starter* isolat uji. Satu ose isolat diinokulasikan secara aseptis ke dalam 10 ml media NB-Cr dan diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker*. Sebanyak 10 ml kultur ditambahkan ke dalam 90 ml media NB-Cr dan diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker*. Sebanyak 20 ml kultur ditambahkan ke dalam 180 ml media NB-Cr dan diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker*. Konsentrasi logam Cr yang digunakan adalah sesuai dengan *range finding*



*test*. Selanjutnya diukur *optical density* (OD) dengan spektrofotometer ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ). Pengukuran OD dilakukan setiap setengah jam dari jam ke-0 sampai dengan jam ke-4, setelah jam ke-4 dilakukan pengukuran setiap 2 jam sekali. Data pengukuran OD ditampilkan dalam bentuk kurva dengan sumbu x sebagai waktu pengukuran dan sumbu y sebagai nilai OD yang didapat.

### **3.2.6 Penentuan Umur Perlakuan *Bioremoval* Cr ( $\mu$ jam) pada Isolat *Bacillus***

Umur perlakuan isolat untuk uji *bioremoval* ditentukan dari kurva pertumbuhan pada media control (NB tanpa logam Cr). Pembuatan kurva pertumbuhan pada media NB tanpa logam sama dengan pembuatan kurva pertumbuhan pada media NB dengan logam. Umur perlakuan dapat dihitung dengan formula sebagai berikut.

$$\mu = (a - b) / 2$$

Keterangan:  $\mu$  = umur kultur yang akan diberi perlakuan; a = waktu fase log akhir; b = waktu fase log awal

### **3.2.7 Uji *Bioremoval* Isolat *Bacillus* Terhadap Logam Cr**

Uji *bioremoval* dimaksudkan untuk mengetahui konsentrasi logam Cr yang dapat di*removal* oleh *Bacillus*.

#### *Pembuatan Larutan Stok*

Larutan stok logam Cr dibuat dengan konsentrasi 200 ppm dengan cara 20 mg  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  ditambahkan akuades sampai dengan 100 ml.

#### *Pembuatan Kultur Starter dan Perlakuan Pemaparan Logam Cr*

Sebanyak 1 ose isolat diinokulasikan secara aseptis ke dalam 20 ml media NB (*nutrient broth*) dan diinkubasi selama 20 jam di atas *rotary shaker*. Sebanyak 20 ml kultur ditambahkan ke dalam 80 ml media NB dan diinkubasi selama 20 jam di atas *rotary shaker* pada suhu ruang. Sebanyak 45 ml kultur ditambahkan ke dalam 180 ml media NB dan diinkubasi sampai mencapai  $\mu$  jam. Sebelum pemaparan logam Cr

kepadatan sel pada  $\mu$  jam dihitung dengan *haemocytometer* hingga kepadatan sel  $10^6$ . Kultur yang telah berumur  $\mu$  jam kemudian dituang ke dalam 3 botol masing-masing 50 ml untuk dipapar logam Cr dengan konsentrasi  $X_1$ ,  $X_2$ , dan  $X_3$  ppm. Medium NB yang mengandung logam Cr dengan konsentrasi  $X_1$ ,  $X_2$ , dan  $X_3$  mg/L tanpa isolat digunakan sebagai kontrol. Masing-masing konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Semua kultur diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm.

#### Pengukuran Konsentrasi Logam Cr yang Diremoval

Sebanyak 50 ml kultur yang telah dipapar logam Cr dengan konsentrasi  $X_1$ ,  $X_2$ , dan  $X_3$  ppm (24 jam inkubasi) disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Filtrat dipisahkan dari *pellet* bakteri dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambah 10 tetes  $\text{HNO}_3$  kemudian dipanaskan selama 10 menit. Selanjutnya logam yang diremoval oleh *Bacillus* diukur konsentrasinya dengan AAS dengan panjang gelombang 357.9 nm. Konsentrasi logam Cr yang diremoval *Bacillus* dan efisiensi *removal* dihitung dengan formula rumus sebagai berikut.

$$R = K_o - K_a$$

$$E = (R / K_o) \times 100\%$$

Keterangan: R= konsentrasi Cr(VI) yang diremoval *Bacillus*;  $K_o$ = konsentrasi awal Cr(VI) dalam medium tanpa inokulum *Bacillus*;  $K_a$ = konsentrasi akhir Cr(VI) pada filtrat medium setelah dipisah dai *pellet Bacillus*; E = efisiensi removal logam Cr(VI)

#### **3.2.8 Uji Viabilitas *Bacillus***

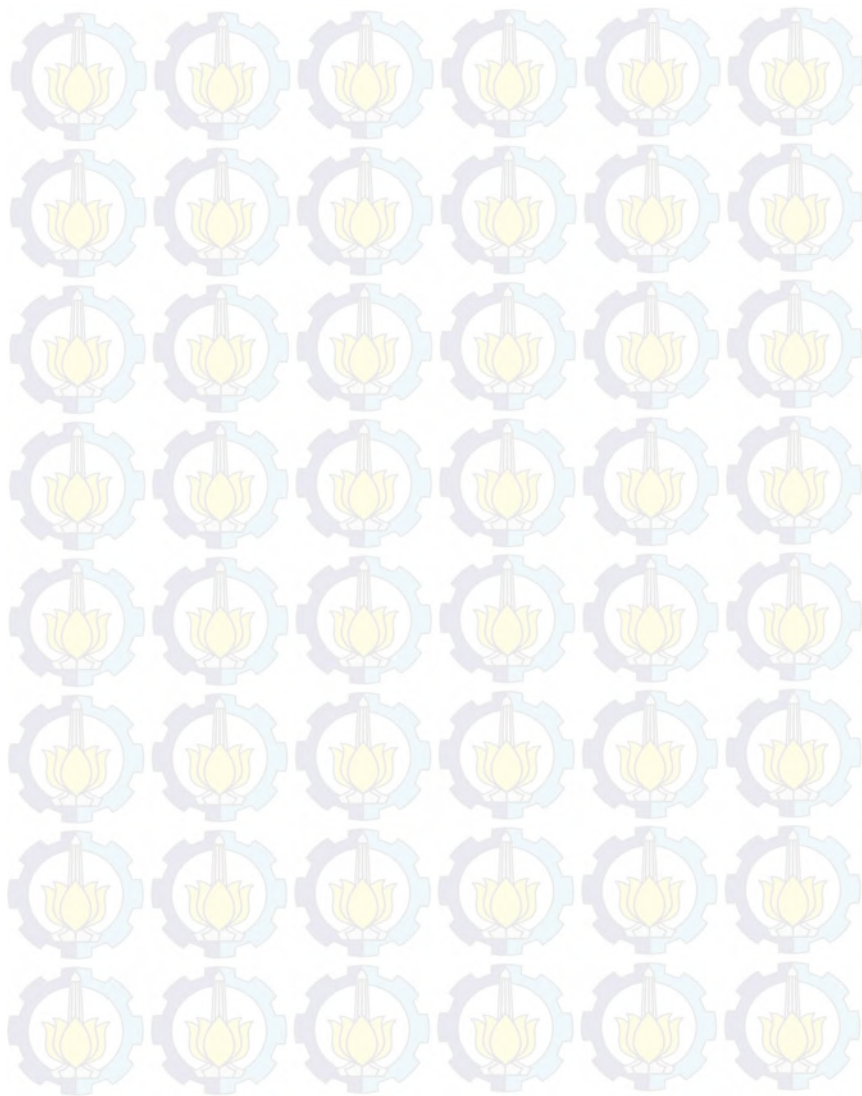
Uji viabilitas isolat dimaksudkan untuk mengetahui viabilitas (daya hidup) *Bacillus* 24 jam setelah dipapar logam Cr. Sebanyak 100  $\mu$ l isolat terpapar logam Cr diinokulasikan pada medium NA dengan metode *pour plate*. Viabilitas ditentukan dengan metode CFU (*colony forming unit*). Jika koloni yang tumbuh  $>300$  maka dilakukan pengenceran hingga didapat koloni yang tumbuh antara 30 – 300 CFU dalam suatu cawan Petri.

Isolat yang tumbuh merupakan isolat yang mempunyai viabilitas terhadap paparan Cr.

### 3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian dilakukan dengan metode deskriptif kualitatif untuk uji resistensi dan uji viabilitas isolat *Bacillus* setelah dipapar logam, serta deskriptif kuantitatif untuk uji *bioremoval* Cr. Rancangan untuk uji *bioremoval* menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), dengan perlakuan 3 isolat dan 3 konsentrasi berbeda.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**





## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Uji Rekonfirmasi Genus *Bacillus*

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS, yaitu *Bacillus cereus* ATCC 1178 sebagai kontrol dan *Bacillus* A6, DA11, S1, S6, dan SS19 yang diisolasi dari Kalimas Surabaya (Zulaika *et al.*, 2012).

Uji konfirmasi dilakukan untuk memastikan bahwa isolat *Bacillus* A6, S1, S6, SS19, dan DA11 adalah benar-benar genus *Bacillus*. Konfirmasi dilakukan dengan metode *generic assignment* berdasarkan *profile matching* karakter kunci yang terdapat pada *Bergey's Manual Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

Hasil *profile matching* isolat *Bacillus* A6, S1, S6, SS19, dan DA11 menunjukkan bahwa isolat tersebut berbentuk basil, bersifat Gram-positif, mampu menghasilkan endospora, memiliki enzim katalase, bersifat aerob sampai anaerob fakultatif, bersifat motil, dan kemoorganotrof (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil Uji Rekonfirmasi *Bacillus* spp.

Karakter Kunci <i>Bacillus</i> *	Isolat				
	A6	DA11	S1	S6	SS19
Berbentuk basil	+	+	+	+	+
Gram positif	+	+	+	+	+
Endospora	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+
Aerob-Fakultatif	+	+	+	+	+
Anaerob	+	+	+	+	+
Motil	+	+	+	+	+
Kemoorganotrof	+	+	+	+	+

\*Holt *et al.*, 1994

Berdasarkan Holt *et al.* (1994), genus *Bacillus* adalah sel yang berbentuk batang, ukuran  $0.5\text{-}2.5 \times 1.2\text{-}10 \mu\text{m}$ . Sel menunjukkan sifat Gram positif dengan pewarnaan Gram. Sel genus *Bacillus* bersifat motil karena adanya *peritrichous flagella*. Genus ini mampu membentuk endospora berbentuk oval dan terkadang berbentuk bulat atau silinder, sangat resisten terhadap kondisi yang tidak menguntungkan. Endospora hanya satu dalam suatu sel. *Bacillus* bersifat aerob hingga fakultatif anaerob untuk kebutuhan oksigennya. Genus ini juga bersifat kemoorganotrof dan katalase positif. Berdasarkan hasil uji konfirmasi di atas, dapat dipastikan bahwa isolat A6, S1, S6, SS19, dan DA11 adalah genus *Bacillus*.

#### **4.2 Resistensi dan Range Finding Test *Bacillus* Terhadap Logam Cr**

Uji resistensi dilakukan untuk mengetahui kemampuan tumbuh isolat *Bacillus* pada medium yang mengandung logam berat Cr. Hasil uji resistensi menunjukkan bahwa isolat dapat tumbuh pada medium *nutrient agar* yang mengandung Cr sampai dengan konsentrasi 300 mg/L (Tabel 4.2). Semua isolat dapat tumbuh dengan baik karena pertumbuhan koloni mengikuti pola *streak* yang dibuat secara penuh (Gambar 4.1).

Koloni *Bacillus* dapat tumbuh dengan baik pada medium yang mengandung logam Cr pada konsentrasi  $\leq 100 \text{ mg/L}$ , dan kemampuan pertumbuhan koloni isolat *Bacillus* mengalami penurunan seiring dengan meningkatnya konsentrasi logam Cr dalam medium *nutrient agar*. Koloni *Bacillus* tumbuh cukup baik pada konsentrasi 150 - 300 mg/L, kecuali isolat *Bacillus* A6 dan S6 yang tumbuh kurang baik pada konsentrasi 250 dan 300 mg/L.

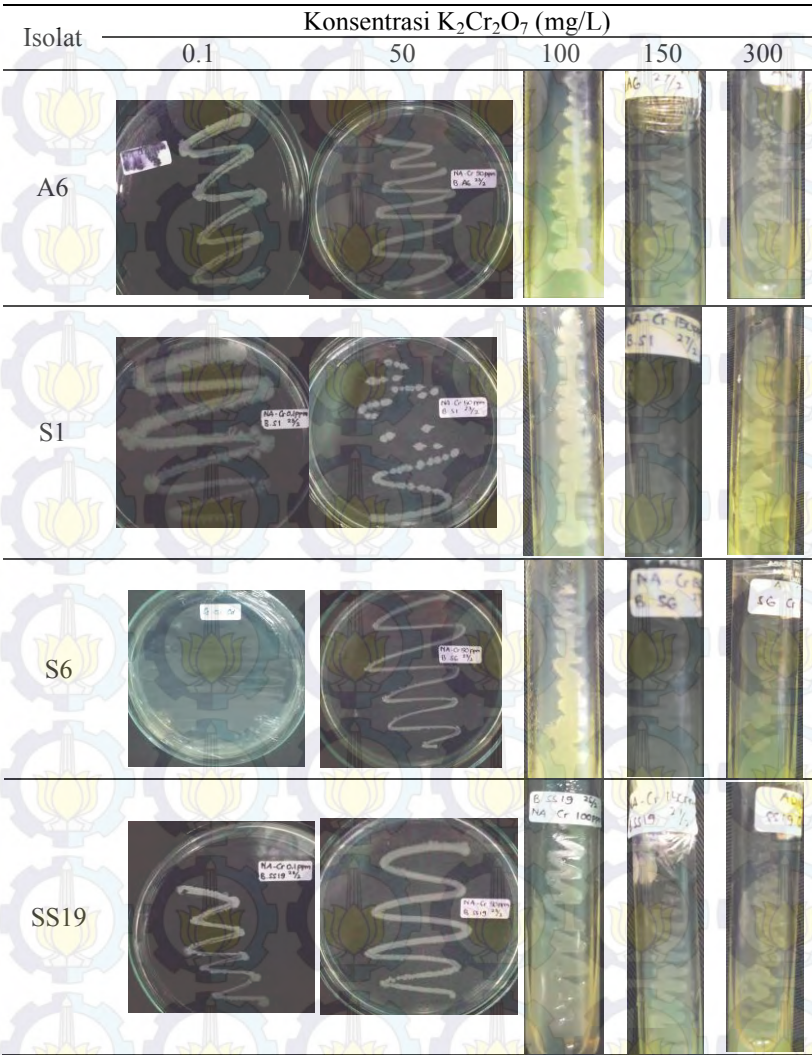
Tabel 4.2 Resistensi *Bacillus* Terhadap  $K_2Cr_2O_7$ 

Isolat <i>Bacillus</i>	Pertumbuhan isolat <i>Bacillus</i> spp. pada medium yang mengandung $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)						
	0.1	50	100	150	200	250	300
A6	+++	+++	+++	++	++	+	+
DA11	+++	+++	+++	++	++	++	++
S1	+++	+++	+++	++	++	++	++
S6	+++	+++	+++	++	++	+	+
SS19	+++	+++	+++	++	++	++	++
<i>B. cereus</i>	+++	+++	+++	++	++	++	++

Keterangan: +++ (baik), ++ (cukup baik), + (kurang baik)

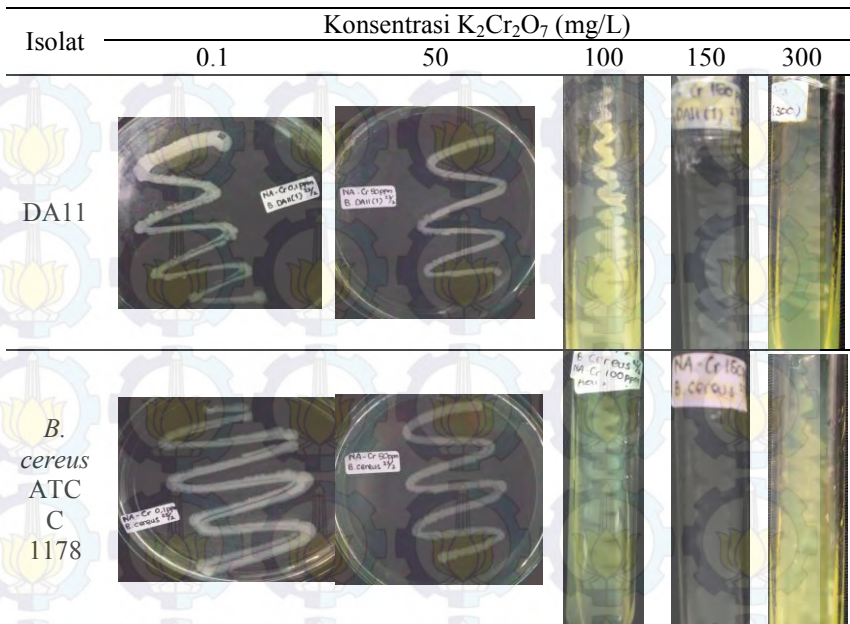
Pertumbuhan koloni semua isolat *Bacillus* pada medium *nutrient agar* mengandung Cr terlihat lebih tipis dibandingkan koloni yang tumbuh pada medium *nutrient agar* tanpa logam. Pada konsentrasi 50 mg/L, koloni yang tumbuh masih memiliki ketebalan yang hampir sama dengan kontrol (isolat yang ditumbuhkan di medium *nutrient agar* tanpa logam). Pada konsentrasi Cr 100 mg/L, koloni yang tumbuh tidak lebih tebal dibanding koloni yang tumbuh pada konsentrasi 50 mg/L, walaupun koloni tumbuh mengikuti pola *streak*. Ketebalan koloni semakin berkurang seiring dengan meningkatnya konsentrasi Cr. Koloni paling tipis tumbuh pada konsentrasi 300 mg/L, seperti terlihat pada Gambar 4.1.





Gambar 4.1 Pertumbuhan Koloni *Bacillus* spp. dalam NA-Cr





Gambar 4.1 Pertumbuhan Koloni *Bacillus* spp. dalam NA-Cr

Berdasarkan hasil uji resistensi tersebut dipilih tiga isolat yang lebih resisten dibandingkan isolat lain sebagai isolat uji *bioremoval* Cr yaitu *Bacillus* S1, SS19 dan DA11. Konsentrasi Cr yang dipilih (*range finding test*) adalah tiga konsentrasi di bawah konsentrasi maksimal, yaitu 50, 100, dan 150 ppm untuk perlakuan *bioremoval*.

Mekanisme resistensi *Bacillus* diatur oleh operon *chlra1* dan gen *chrA* yang diduga merupakan transpoter Cr(VI). Operon *chlra1* dan gen *chrA* telah diketahui merupakan *inducible genes*, yaitu gen yang akan terekspresi dalam kondisi tertentu. Adanya penambahan Cr ke dalam medium pertumbuhan menyebabkan aktifnya gen *chrA*. Ekspresi dari kedua gen tersebut adalah suatu protein transporter (*chrA1*) yang dapat mengeluarkan kromat dari dalam sel menggunakan *proton-motive force* sehingga *chrA1*

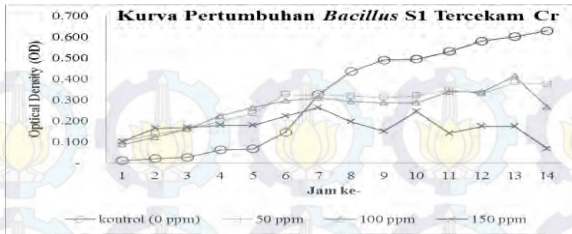
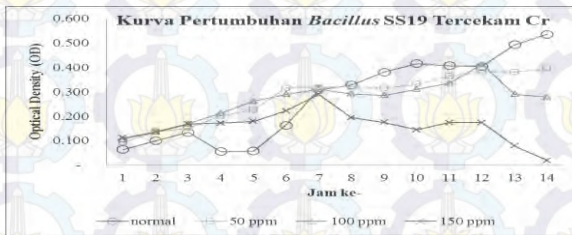
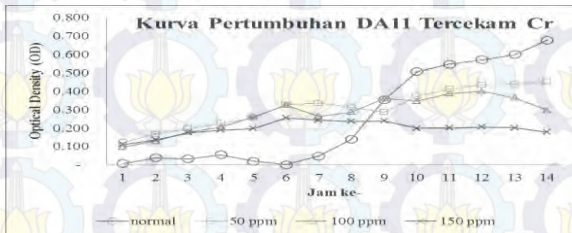
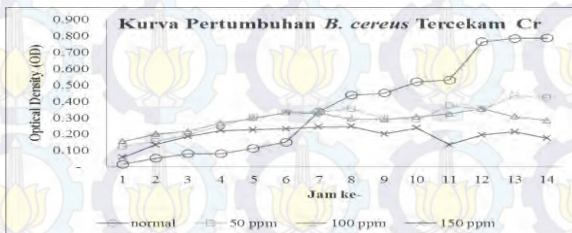
bertanggung jawab terhadap sifat resistensi *Bacillus* terhadap Cr (He *et al.*, 2010).

Mekanisme masuknya kromium heksavalen ( $\text{Cr}^{6+}$ ) ke dalam sel bakteri, salah satunya melalui jalur masuknya sulfat ke dalam sel.  $\text{Cr}^{6+}$  dapat masuk ke dalam membran sel melalui jalur penyerapan sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) karena  $\text{Cr}^{6+}$  memiliki struktur yang sama dengan sulfat sehingga  $\text{Cr}^{6+}$  dapat dengan mudah masuk ke dalam membran sel menggantikan  $\text{SO}_4^{2-}$  (Wenbo *et al.*, 2000). Jika di dalam sel bakteri terdapat enzim intraselular kromat reduktase,  $\text{Cr}^{6+}$  akan direduksi menjadi  $\text{Cr}^{3+}$ . Jika tidak terdapat enzim intraselular kromat reduktase,  $\text{Cr}^{6+}$  terakumulasi di dalam sel dan menginduksi operon *chr*, sehingga mengaktifkan pompa efluks kromat yang dikode oleh *chrA*. Dengan demikian, sel bakteri terlindung dari toksisitas  $\text{Cr}^{6+}$  karena  $\text{Cr}^{6+}$  dikeluarkan dari sel melalui pompa eflukskromat tersebut (Joutey *et al.*, 2015).

Menurut Colak *et al.* dalam Trihadiningrum *et al.* (2014) bakteri Gram-positif memiliki kemampuan lebih tinggi dalam mengikat logam dibandingkan bakteri Gram-negatif. Struktur dinding sel bakteri Gram-positif tersusun atas asam teikoat (*teichoic acids*) dan bentuk asam lain yang berasosiasi dengan dinding sel. Selain itu, adanya fosfat dan gugus karboksil pada dinding sel bakteri Gram-positif berperan penting dalam pengikatan logam.

#### 4.3 Viabilitas Isolat *Bacillus* yang Tercekam Logam Cr

Pola pertumbuhan *Bacillus* yang tercekam logam Cr digunakan untuk mengetahui daya hidup isolat pada media yang terpapar logam Cr dengan konsentrasi berdasarkan *range finding test*, yaitu 50, 100, dan 150 mg/L *nutrient broth*-Cr. Daya hidup isolat dapat dilihat dari pola pertumbuhan pada Gambar 4.2 sampai 4.5

Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan *Bacillus S1*Gambar 4.3 Kurva Pertumbuhan *Bacillus SS19*Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan *Bacillus DA11*Gambar 4.5 Kurva Pertumbuhan *Bacillus cereus* ATCC 1178



Berdasarkan pola pertumbuhan pada gambar 4.2 sampai 4.5, isolat *Bacillus* menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama. Pertumbuhan semua isolat yang tercekam logam lebih rendah dibanding kontrol (pertumbuhan isolat pada media tanpa logam). Semua isolat menunjukkan pola pertumbuhan yang relatif rendah pada konsentrasi 150 mg/L dibanding konsentrasi 50 dan 100 mg/L.

Secara umum tidak terjadi fase lag pada kurva pertumbuhan masing-masing kultur *Bacillus* yang tercekam logam. Kurva pertumbuhan semua kultur langsung memasuki fase log sejak pengukuran OD jam ke-0. Isolat *Bacillus* yang digunakan telah diuji resistensinya terhadap logam Cr, dengan hasil uji semua isolat *Bacillus* mampu tumbuh dengan baik pada media *nutrient agar* yang mengandung Cr 300 mg/L (Tabel 4.2), sehingga semua isolat ketika dikultur pada medium *nutrient broth*-Cr dengan konsentrasi di bawah 300 mg/L tidak perlu lagi beradaptasi dan langsung memasuki fase log.

Kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* yang tercekam logam Cr menunjukkan nilai OD paling tinggi berkisar pada nilai 0,4, baik *Bacillus* S1, SS19, DA11, maupun *Bacillus cereus* ATCC 1178 sebagai kontrol. Nilai tersebut lebih rendah dibandingkan dengan nilai OD isolat *Bacillus* yang dikultur pada medium *nutrient broth* tanpa penambahan logam Cr (0,5 – 0,7). Selain itu, nilai OD juga semakin lebih rendah seiring meningkatnya konsentrasi logam Cr yang ditambahkan dalam medium. Penurunan nilai OD cukup drastis terlihat pada kultur yang ditumbuhkan pada medium *nutirnet broth*-Cr konsentrasi 150 mg/L. Di sisi lain, kultur yang ditumbuhkan dalam medium *nutrient broth*-Cr konsentrasi 50 dan 100 mg/L tidak terlalu berbeda jauh. Hal ini terjadi pada semua kultur, baik *Bacillus* S1, SS19, DA11, dan *B. cereus* ATCC 1178 sebagai pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa logam Cr pada konsentrasi NB-Cr 50, 100, dan 150 mg/L memberikan efek buruk terhadap pertumbuhan isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11.



Semua kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* menunjukkan pola pertumbuhan lebih rendah dibanding kontrol (medium tanpa logam Cr). Adanya perbedaan pola pertumbuhan antara kultur yang ditumbuhkan pada medium tanpa logam Cr dengan kultur pada medium yang ditambah logam Cr mengindikasikan efek toksik Cr terhadap pertumbuhan sel terjadi selama 24 jam masa inkubasi. Efek toksik berkaitan dengan adanya perubahan materi genetik dan reaksi fisiologis serta metabolisme genus *Bacillus* (Losi *et al.*, 1994; Cheng and Li, 2009). Sementara itu, Basu *et al.* (2014) menyebutkan mikroorganisme yang terpapar kromium dalam jangka waktu lama dapat menurunkan diversitas mikrobial, populasi, dan aktivitas mikroorganisme.

#### **4.4 Penentuan Umur Isolat *Bacillus* ( $\mu$ jam) untuk Perlakuan Bioremoval**

Umur perlakuan ( $\mu$  jam) isolat *Bacillus* untuk *bioremoval* logam Cr ditentukan berdasarkan kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan didapat dari hasil pengukuran OD kultur menggunakan spektrofotometer. Umur perlakuan didapatkan dengan menghitung sesuai persamaan pada subbab 3.2.5.

Berdasarkan hasil pengukuran OD (Lampiran 9) dan kurva pertumbuhan, secara umum pola pertumbuhan isolat *Bacillus* menunjukkan pola yang hampir sama. Fase lag secara umum terjadi pada jam ke-0 sampai ke-5, kecuali pada isolat DA11 yang fase lagnya terjadi pada jam ke-0 sampai ke-6 (Gambar 4.6). Menurut Prescott (2002), fase lag merupakan fase yang terjadi ketika suatu mikroorganisme ditumbuhkan dalam medium baru, biasanya tidak terjadi pertambahan jumlah sel. Pada fase ini, sel menyiapkan komponen-komponen untuk proses pembelahan sel, seperti sintesis kofaktor, ribosom, dan ATP yang dibutuhkan untuk proses pembelahan sel. Sel-sel juga melakukan replikasi DNA, meningkatkan massa sel, dan akhirnya membelah.

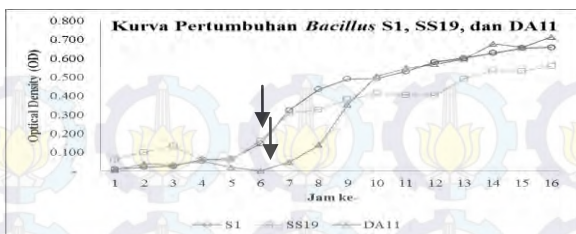
Fase lag pada isolat *Bacillus* terjadi karena isolat *Bacillus* pada mulanya ditumbuhkan di medium *nutrient agar*, kemudian

inokulum dipindahkan ke medium *nutrient broth* untuk diukur kerapatan selnya. Perubahan medium dari padat ke cair menyebabkan sel beradaptasi ke jenis medium baru, sehingga membutuhkan waktu untuk menyiapkan komponen-komponen pembelahan sel. Hal ini sesuai dengan Prescott (2002) yang menyatakan inokulasi kultur dari medium yang berbeda dapat memperpanjang fase lag (Prescott, 2002).

Menurut Madigan *et al.* (2012) lama fase lag dapat lebih lama atau lebih cepat, tergantung kondisi inokulum sebelumnya. Apabila suatu kultur yang sudah memasuki fase eksponensial dipindahkan ke medium baru dengan kondisi yang sama dengan sebelumnya, fase lag tidak akan terjadi dan fase eksponensial terjadi secara langsung. Sebaliknya, apabila kultur yang sudah tua diinokulasi ke medium baru yang sama, terjadi fase lag karena sel membutuhkan waktu untuk biosintesis.

Berdasarkan kurva pertumbuhan yang didapat, diketahui umur perlakuan ( $\mu$  jam) untuk uji bioremoval *Bacillus* adalah jam ke-12, yang ditunjukkan dengan tanda panah pada gambar 4.6. Pada jam tersebut telah memasuki fase eksponensial, yaitu suatu fase ketika mikroorganisme tumbuh dan membelah pada laju maksimal. Pada fase ini, laju pertumbuhan berlangsung konstan. Populasi mikroorganisme di fase ini berkembang seragam, baik secara fisik maupun kimia, sehingga kultur yang sedang dalam fase eksponensial sering digunakan untuk pengujian fisiologis maupun biokimia (Prescott, 2002).

Laju pertumbuhan di fase eksponensial meningkat cepat. Hal tersebut dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, seperti suhu dan komposisi medium kultur. Secara umum, prokariot tumbuh lebih cepat dibandingkan mikroorganisme eukariot. Hal ini terjadi karena sel berukuran lebih kecil sehingga dapat meningkatkan kapasitas penyerapan nutrisi dan pembuangan sisa metabolisme dibandingkan sel yang berukuran lebih besar, akibatnya mempengaruhi laju pertumbuhannya (Madigan *et al.*, 2012).



Gambar 4.6 Pola Pertumbuhan *Bacillus* S1, SS19, dan DA11 dalam NB

#### 4.5 Uji Bioremoval Logam Cr

Uji *bioremoval* bertujuan untuk mengetahui besarnya konsentrasi logam Cr yang dapat di-*removal* oleh *Bacillus* dari medium kulturnya. Isolat *Bacillus* berusia  $\mu$  jam dihitung kepadatan selnya dengan *haemocytometer* dan didapatkan kepadatan sel yang akan diuji adalah  $9,1 \cdot 10^6$  sel/ml untuk isolat *Bacillus* S1,  $4,3 \cdot 10^6$  sel/ml untuk isolat *Bacillus* SS19, dan  $16,3 \cdot 10^6$  sel/ml untuk isolat *Bacillus* DA11 (Lampiran 9). Kemudian isolat dipapar logam Cr selama 24 jam.

Konsentrasi logam Cr yang digunakan adalah 100 dan 150 mg/L. Konsentrasi logam Cr tersebut setelah diukur menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectroscopy*) menurun menjadi 1.9 mg/L dan 38.8 mg/L. Penurunan konsentrasi ini disebabkan oleh adanya pengkelatan logam Cr pada penyusun nutrisi medium *nutrient broth*. Menurut Sholikah (2013) logam memiliki kemampuan berikatan dengan komponen medium *Nutrient Broth*, yaitu pepton dan *meat extract*. Dari seluruh komponen NB, terdapat protein, yang terdiri atas asam amino-asam amino. Menurut Darmono (1995) dalam Nohong (2010), protein yang memiliki sisi-sisi aktif dapat mengikat ion-ion logam ataupun senyawa lainnya. Pengikatan pepton (protein) dengan logam Cr menyebabkan terbentuknya metaloprotein (Rao *et al.*, 1998). Pengkelatan ini akan menyebabkan konsentrasi Cr dalam



media menurun sehingga perlakuan logam Cr sebagai uji *bioremoval* adalah 1.9 mg/L dan 38.8 mg/L (Tabel 4.3).

Hasil uji *bioremoval* menunjukkan bahwa semua isolat *Bacillus* mampu me-*removal* hampir semua konsentrasi yang dipapar 1.9 mg/L, sedangkan pada konsentrasi 38.8 mg/L mampu di-*removal* dan tersisa 18.1 mg/L pada isolat *Bacillus* S1, 9.7 mg/L pada isolat *Bacillus* SS19, dan 9 mg/L pada isolat *Bacillus* DA11.

Tabel 4.3 *Bioremoval* Logam Cr Oleh *Bacillus*

Isolat	Konsentrasi perlakuan (mg/L)	Konsentrasi terukur AAS*	Rata-rata konsentrasi tersisa dalam media(mg/L)*
S1	100	1.9	< 0.0051
	150	38.8	18.1
SS19	100	1.9	< 0.0051
	150	38.8	9.7
DA11	100	1.9	< 0.0051
	150	38.8	9

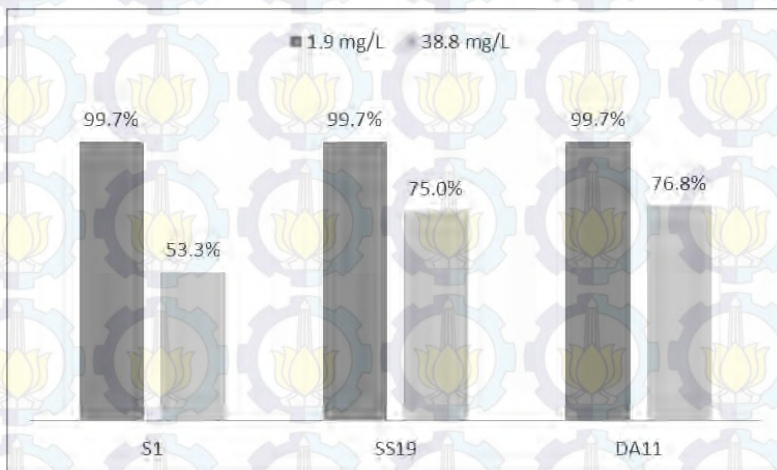
\*Sumber: Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi Baristand Industri Surabaya

Efisiensi *bioremoval* Cr konsentrasi 1.9 mg/L semua isolat menunjukkan hasil yang sama, yaitu 99.7%, sedangkan pada konsentrasi Cr 38.8 mg/L terdapat perbedaan; pada *Bacillus* S1 53.3%, SS19 75% dan DA11 76.8% (Tabel 4.4 dan Gambar 4.5). Efisiensi *bioremoval* isolat *Bacillus* DA11 dan SS19 tidak berbeda jauh, sedangkan isolat *Bacillus* S1 relatif lebih rendah dibanding SS19 dan DA11. Hal ini mengindikasikan isolat *Bacillus* DA11 dan SS19 memiliki kemampuan *removal* yang hampir sama dan lebih tinggi dibanding isolat *Bacillus* S1.



Tabel 4.4 Efisiensi *Removal* Logam Cr oleh *Bacillus*

Isolat	Konsentrasi awal (mg/L)	Konsentrasi yang tersisa (mg/L)	Konsentrasi yang di- <i>removal</i> (mg/L)	Efisiensi <i>removal</i> (%)
S1	1.90	< 0.0051	1.89	99.70
	38.80	18.10	20.70	53.30
SS19	1.90	< 0.0051	1.89	99.70
	38.80	9.70	29.10	75.00
DA11	1.90	< 0.0051	1.89	99.70
	38.80	9.00	29.80	76.80

Gambar 4.5 Persentase Efisiensi *Removal* Logam Cr oleh *Bacillus* spp.

Beberapa penelitian menyatakan bahwa logam Cr dapat diserap masuk ke dalam tubuh bakteri. Wenbo *et al.* (2000) mengemukakan bahwa  $\text{Cr}^{6+}$ , dalam bentuk  $(\text{CrO}_4)^{2-}$ , dapat masuk ke dalam sel bakteri melalui jalur sulfat  $(\text{SO}_4)^{2-}$ . Adanya

persamaan struktur antara  $(\text{CrO}_4)^{2-}$  dan  $(\text{SO}_4)^{2-}$  menyebabkan  $(\text{CrO}_4)^{2-}$  dapat dengan mudah masuk ke dalam sel bakteri. Di dalam tubuh bakteri,  $\text{Cr}^{6+}$  yang bersifat toksik direduksi menjadi  $\text{Cr}^{3+}$  melalui beberapa tahapan. *Removal* atau reduksi Cr dapat dilakukan secara aerobik maupun anaerobik (EPA dalam Thatoi *et al.*, 2014). *Bacillus* merupakan salah satu mikroba yang dapat mereduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) (Chirwa and Molokwane, 2011). Reduksi Cr yang dilakukan oleh *Bacillus* terjadi secara aerobik (Ohtake dalam Thatoi *et al.*, 2014). Proses ini membutuhkan oksigen ( $\text{O}_2$ ) sebagai elektron aseptor (EPA dalam Thatoi *et al.*, 2014) dan NAD(P)H sebagai elektron donor, dengan melibatkan NADH-dehidrogenase yang terletak di periplasma (Ngwenya and Chirwa, 2011). Cr(VI) menerima tiga elektron dari NADH sehingga Cr(VI) diubah menjadi Cr(III), melalui dua tahap. Cr(VI) menerima satu elektron dari molekul NADH sehingga menjadi Cr(V), kemudian Cr(V) menerima dua elektron sehingga menjadi Cr(III) (Singh *et al.* dalam Thatoi *et al.*, 2014), dengan reaksi sebagai berikut:



Cr(III) selanjutnya terikat ke gugus fungsional bermuatan negatif yang ada pada protein di membran sel. Cr(III) juga dapat membentuk kompleks dengan membran sel dan kapsul eksopolimer yang dapat menghambat masuknya Cr(III) ke dalam sitoplasma (McLean and Beveridge dalam Thatoi *et al.*, 2014).

#### 4.6 Uji Viabilitas *Bacillus*

Uji viabilitas (daya hidup) dilakukan untuk mengetahui daya hidup isolat *Bacillus* setelah dipapar logam Cr. Berdasarkan hasil uji viabilitas, terlihat bahwa semua isolat masih dapat tumbuh di medium *nutrient agar* tanpa logam Cr. Isolat *Bacillus* S1 yang

dikultur di medium *nutrient broth*-Cr konsentrasi 50 mg/L tumbuh sebanyak 219 CFU dan yang dikultur di medium *nutrient broth*-Cr konsentrasi 100 mg/L tumbuh sebanyak 148 CFU. Isolat SS19 yang dikultur di medium *nutrient broth* -Cr 50 dan 100 mg/L tumbuh >300 CFU. Isolat DA11 yang dikultur di medium *nutrient broth* -Cr 50 mg/L tumbuh sebanyak >300 CFU dan yang dikultur di medium *nutrient broth* -Cr 100 mg/L tumbuh sebanyak 54 CFU. Sementara itu, isolat S1 dan SS19 yang dikultur di medium *nutrient broth* -Cr 150 mg/L tidak, sedangkan isolat DA11 tumbuh sebanyak 39 CFU (Tabel 4.5). Dari hasil tersebut masing-masing isolat *Bacillus* mempunyai daya hidup setelah dipapar logam Cr pada media *nutrient broth* -Cr mg/L, yang analog dengan pemaparan 38.8 mg/L Cr<sup>6+</sup>.

Tabel 4.5 Hasil Uji Viabilitas Isolat *Bacillus*

Isolat	Konsentrasi Cr yang dipaparkan (mg/L)		
	50	100	150
S1	219 CFU/ml	148 CFU/ml	Tidak ada pertumbuhan
SS19	>300 CFU/ml	>300 CFU/ml	Tidak ada pertumbuhan
DA11	>300 CFU/ml	54 CFU/ml	39 CFU/ml

Hasil uji viabilitas juga menunjukkan jumlah koloni yang tumbuh semakin sedikit (Tabel 4.5) seiring dengan meningkatnya konsentrasi Cr yang dipaparkan. Bahkan pada isolat *Bacillus* S1 dan SS19 tidak tumbuh setelah dipapar 150 mg/L *nutrient broth* – Cr (yang analog dengan 38.8 mg/L Cr<sup>6+</sup>).

Viabilitas adalah tingkat ketahanan dan kemampuan hidup dari suatu organisme pada lingkungan yang baru (Sobariah, 2007). Viabilitas bakteri berkaitan erat dengan kondisi fisiologis sel bakteri, seperti ketersediaan nutrisi yang dibutuhkan yaitu sumber O<sub>2</sub>, C, atau N untuk menunjang metabolismenya, serta faktor lingkungan, seperti pH, tekanan osmotik, serta keberadaan logam berat (Effendi, 2008).



Telah diketahui bahwa logam Cr, khususnya  $\text{Cr}^{6+}$ , sangat berbahaya apabila terdapat di dalam suatu sel. Di dalam sel,  $\text{Cr}^{6+}$  direduksi menjadi Cr dengan bilangan oksidasi yang lebih rendah, seperti  $\text{Cr}^{5+}$ ,  $\text{Cr}^{4+}$ , atau  $\text{Cr}^{3+}$ , diikuti dengan pembentukan ROS (*reactive oxygen species*). ROS menyebabkan hasil reduksi  $\text{Cr}^{6+}$  mempengaruhi fungsi selular melalui kerusakan asam nukleat, seperti lepasnya ikatan ganda DNA, DNA-DNA atau DNA-protein *crosslinks*; tetapi terdapat beberapa jalur yang dapat dilakukan sel untuk mencegah terjadinya hal-hal tersebut. Toksisitas  $\text{Cr}^{6+}$  dapat dikurangi dengan (1) aktivasi *checkpoint* kerusakan DNA, yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sel untuk memperbaiki dan mencegah supaya kromosom yang rusak tidak semakin banyak, (2) sistem pertahanan dengan antioksidan, yang dapat menetralkan ROS yang dihasilkan dari reduksi  $\text{Cr}^{6+}$ , dan (3) apoptosis untuk mengurangi sel-sel yang mengalami kerusakan berat (Sapojnikova *et al.*, 2007).



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

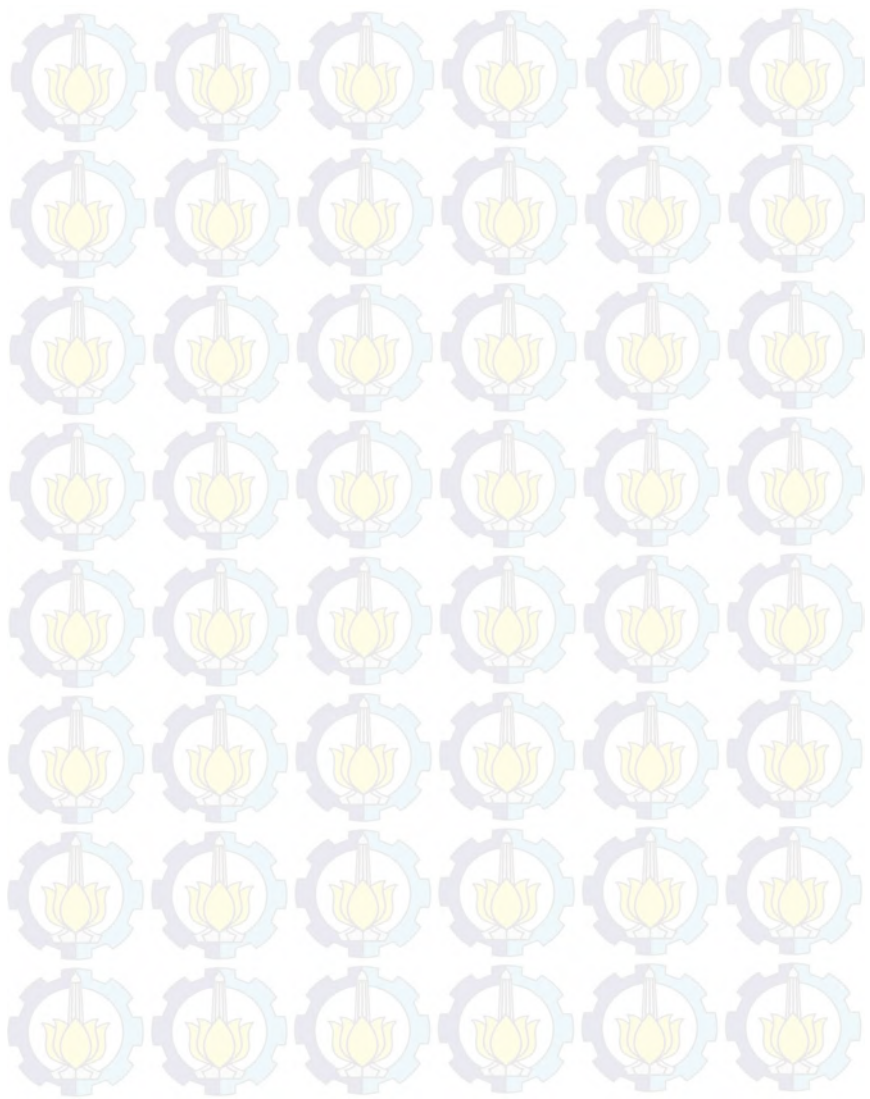
Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 resisten terhadap logam  $\text{Cr}^{6+}$  pada konsentrasi  $\leq 38.8$  mg/L, dengan respon pertumbuhan koloni yang berbeda-beda tiap isolat.
2. Isolat *Bacillus* DA11 memiliki potensi *bioremoval* Cr lebih tinggi dibanding isolat *Bacillus* S1 dan SS19, yaitu mampu me-*removal* logam Cr sebesar 29.8 mg/L dari konsentrasi awal 38.8 mg/L, dengan efisiensi *bioremoval* 76.8%.

#### 5.2 Saran

Untuk mengembangkan potensi resistensi dan *bioremoval* Cr pada *Bacillus*, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengoptimalkan *bioremoval* Cr dalam bioreaktor yang berskala lapangan dengan faktor lingkungan yang terkendali.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## DAFTAR PUSTAKA

Ahmad, W., Shahir, S., dan Zakaria, Z. A. 2009. Mechanisms of Bacterial Detoxification of Cr(VI) from Industrial Wastewater in the Presence of Industrial Effluents as Potential Energy Source. **Thesis**. Malaysia: Department of Chemistry Faculty of Science Universiti Teknologi Malaysia

Arinda, T. Shovitri, M., dan Zulaika, E. 2012. Heavy Metals Resistance of *Bacillus*. **Scientific Conference of Environmental Technology IX, Advance in Agricultural and Municipal Waste Technology to Anticipate Food and Energy Crisis**. Surabaya, 10<sup>th</sup> July 2012

Basu, S., Dasgupta, M., dan Chakraborty, B. 2014. Removal of Chromium (VI) by *Bacillus subtilis* Isolated from East Calcutta Wetlands, West Bengal, India. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics 14(1): 7-10**

Chen, J. P. 2012. **Decontamination of Heavy Metals: Process, Mechanisms, and Applications**. Florida: Taylor & Francis Group

Cheng, G. dan Li, X. 2009. Bioreduction of Chromium (VI) by *Bacillus* sp. Isolated from Soils of Iron Mineral Area. **European Journal of Soil Biology 45: 483-487**

Chirwa, E. M. N. dan Molokwane, P. E. 2011. Biological Cr(VI) Reduction: Microbial Diversity, Kinetics and Biotechnological Solutions to Pollution. **Biodiversity: 75-100**

Chojnacka, K. 2010. Biosorption and Bioaccumulation – The Prospects for Practical Applications. **Environmental International 36: 299-307**

Das, N., Vimala, R., dan Karthika, P. 2008. Biosorption of Heavy Metals – An Overview. **Indian Journal of Biotechnology Vol.7: 159-169**

Effendi, M. 2008. **Faktor Lingkungan Mikroba – Agroindustri produk Fermentasi**. Universitas Brawijaya: Malang

Focardi, S., Pepi, M., dan Focardi, S. E.. 2013. Microbial Reduction of Hexavalent Chromium as a Mechanism of Detoxification and Possible Bioremediation Applications. **Biodegradation**  
<http://dx.doi.org/10.5772/56365>

Govind, P. dan S., Madhuri. 2014. Heavy Metals Causing Toxicity in Animals and Fishes. **Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences Vol 2(2): 17-23**

Harley, J. P. and Prescott, L. M. 2002. **Laboratory Exercise in Microbiology Fifth Edition**. The McGraw-Hill Company

He, M., Li, X., Guo, L., Miller, S. J., Rensing, C., dan Wang, G. 2010. Characterization and Genomic Analysis of Chromate Resistant and Reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. **BMC Microbiology 10: 221**

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, H. A., Staley, J. T., dan William, S. T. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9<sup>th</sup> Edition**. Baltimor: William and Wilkinss

Hoyle, B. dan Beveridge, T. J. 1983. Binding of Metallic Ions to The Outer Membrane o *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology 46: 749-752**

Joutey, N. T., Sayel, H., Bahafid, W., dan Ghachtouli, N. E. 2015. Mechanisms of Hexavalent Chromium Resistance and Removal by



Microorganisms. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 233: 45-69**

Katz, S. A. dan Salem, H.. 1994. **The Biological and Chemistry of Environmental Chromium**. USA: VCH Publishers, Inc.

Laxman, R. S. dan More, S. 2001. Reduction of Hexavalent Chromium by *Streptomyces griseus*. **Mineral Engineering 15 (2002): 831-837**

Lepora, N. 2005. **Chromium**. New York: Marshal Cavendish Benchmark

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., dan Clark, D. P. 2012. **Brock Biology of Microorganisms Thirteenth Edition**. San Francisco: Pearson Education, Inc

Ngwenya, N. dan Chirwa, E. M. N. 2011. Biological Removal of Cationic Fission Products from Nuclear Wastewater. **Water Science Technology 63(1): 124-128**

Nohong. 2010. Pemanfaatan Limbah Tahu Sebagai Bahan Penyerap Logam Krom, Kadmium, dan Besi dalam Air Lindi TPA. **Jurnal Pembelajaran Sains Vol. 6(2): 257-269**

Nriagu, J. O. dan Neiboer, E. 1998. **Chromium In The Natural and Human Environments**. Canada: John Wiley and Sons, Inc.

Ohtake, H., Cervantes, C., dan Silver, S. 1987. Decreased Chromate Uptake In *Pseudomonas fluorescens* Carrying A Chromate Resistance Plasmid. **Journal of Bacteriology, August 1987: 3853-3856**

Pal, A. dan Paul, A. K.. 2004. Aerobic Chromate Reduction By Chromium-resistant Bacteria Isolated From Serpentine Soil. **Microbiological Research** **159** (2004) 347-357

Parmar, A. N., Oosterbroek, T., Del Sordo, S., Segreto, A., Santangelo, A., Dal Fiume, D., dan Orlandini, M. 2000. Broad-band BeppoSAX Observation of The Low Mass X-Ray Binary X 1822-371. **Astronomy Astrophys.** **365**: 175-180

Prescott, L. M. 2002. **Microbiology 5<sup>th</sup> Edition**. The McGraw-Hill Company

Ramirez-Diaz, M. I., Diaz-Perez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campo-Garcia, J., dan Cervantes, C. 2008. Mechanism of Bacterial Resistance to Chromium Compounds. **Biometals** **21(3)**: 321-332

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., dan Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** **62(3)**: 597-635

Roza, G. 2013. **Chromium**. New York: Gareth Stevens Publishing

Sapojnikova, N., Kartvelishvili, T., Abuladze, M., dan Asatiani, N. 2007. How a Cell Defends Itself against Genomic Instability Caused by Chromium (VI). **New Research on Genomic Instability (2007)**: 207-260

Sholikah, U. 2013. *Bioremoval* Kadmium dan Seng Oleh *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada Limbah Sintetik dan Limbah Cair Industri Elektroplating. **Thesis**. Program Magister Jurusan Teknik Lingkungan FTSP, Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Sobariah, E. 2007. Viabilitas Bakteri Probiotik In Vitro dan pengaruh Pemberian Air Beroksigen Terhadap Viabilitas Bakteri Probiotik Secara In Vitro. **Thesis**. Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

Thacker, U. Parikh, R., Shouche, Y., dan Madamwar, D.. 2006. Hexavalent Chromium Reduction by *Providencia* sp.. **Process Biochemistry**, **41**, 1332-1337 Elsevier

Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Prasad Rath, B, dan Das, N.. 2014. Bacterial Chromate Reductase, A Potential Enzyme For Bioremediation of Hexavalent Chromium: A Review. **Journal of Environmental Management** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014>

Tian-Pei, H., Ying, X., Jie-Ru, P., Zhi, C., Li Fen, L., Lei, X., Ling-Ling, Z., dan Xiong, G.. 2014. Aerobic Cr(VI) Reduction by an Indegenous Soil Isolate *Bacillus thuringiensis* BRC-ZYR2. **Pedosphere** **24(5): 652-661, 2014**

Trihadiningrum, Y., Arinda, T., Sholikah, U., Shovitri, M., Wilujeng, S. A., dan Pandebesie, E. S. 2014. Bioremoval of Chromium, Copper, and Cadmium by *Bacillus cereus* in Stimulated Electroplating Wastewater. **IPTEK, Journal of Proceeding Series Vol. 1:31-35**

Velasques, L. dan Dussan, J. 2009. Biosorption and Bioaccumulation of Heavy Metals on Dead and Living Biomass of *Bacillus sphaericus*. **Journal of Hazardous Materials** **167 (2009): 713-716**

Vijayarghavan, K. dan Yun, Y. S. 2008. Bacterial Biosorbents and Biosorption. **Biotechnology Advances** **26: 266-291**

Viti, C., Decorosi, F., Mini, A., Tatti, E., dan Giovannetti, L.. 2009. Involvement of The *oscA* Gene In The Sulphur Starvation Response



and In Cr(VI) Resistance In *Pseudomonas corrugate* 28.  
**Microbiology (2009), 155, 95-105**

Wenbo, Q., Reiter, R. J., Tan, D. X., Garcia, J. J., Manchester, L. C., Karbownik, M., dan Calvo, J. R. 2000. Chromium (III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and Its Reduction by Antioxydants; Comparative Effects of Melatonin, Ascorbat, and Vitamin E. **Environmental Health Perspection 108(5): 399-402**

Yun-guo, L., Bao-ying, F., Ting, F., Hai-zhou, Z., dan Xin, L.. 2008. Tolerance and Removal of Chromium (VI) By *Bacillus* sp. Strain YB-1 Isolated From Electroplating Sludge. **Trans Nonferrous Met. Soc. China 18(2008) 480-487**

Zabochnicka-Swiatek, M. dan Krzywonos, M. 2014. Potential of Biosorption and Bioaccumulation Processes of Heavy Metal Removal. **Journal of Environmental Studies Vol. 23(2): 551-561**

Zulaika, E, Luqman, A., Arindah, T., dan Sholikah, U.. 2012. Bakteri Resisten Logam Berat yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator. **Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development**. Teknik Lingkungan, FTSP-ITS, 21 Pebruari 2012

Zulaika, E. dan Sembiring, L. 2014. Indigenous Mercury Resistant Bacterial Isolates Belong To The Genus *Bacillus* From Kalimas Surabaya As A Potential Mercury Bioreducer. **Journal Applied Environment Biological Sciences, 4(1): 72-76**

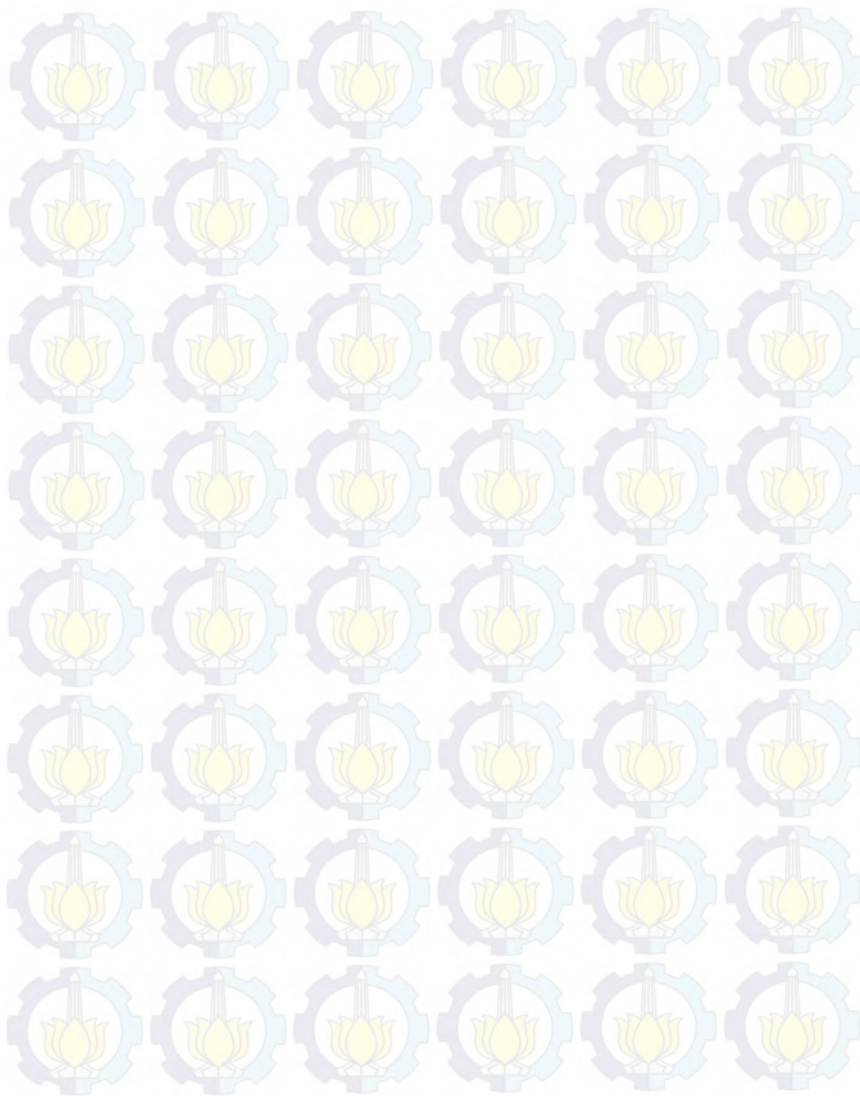
Zulaika, E., Sembiring, L., dan Soegianto, A.. 2012. Characterization and Identification of Mercury-resistant Bacteria From Kalimas River Surabaya-Indonesia By Numerical Phenetic Taxonomy. **Journal Basic and Applied Science Res., 2(7)7263-7269, 2012 TextRoad Publication**



Zulaika, E., Sholikhah, U., dan Prasetya, Y. A. 2012. Potensi Bakteri *Bacillus* Sebagai Agenia Bioremediasi Limbah Industri yang Mengandung Merkuri. **Seminar Pemetaan Potensi dan Inovasi Ilmu Pengetahuan, Teknologi, Seni, dan Budaya (IPTEKSB) Jatim**. Ristek-ITS, Surabaya, 2 Mei 2012

Zulaika, E., Widiyanti, A., dan Shovitri, M. 2011. Bakteri Resisten Merkuri Endogenik Hilir Kalimas Surabaya. **Seminar Nasional Teori & Aplikasi Teknologi Kelautan**. Surabaya, 15-16 Desember 2011

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## Lampiran 1 : Komposisi Medium NA

### **Komposisi Medium NA**

Peptone .....	5.0 gram
Beef extract .....	3.0 gram
Agar .....	15.0 gram
Distilled water .....	1,000 ml
Diautoklaf dengan tekanan 121 lb selama 15 menit	

(Harley and Prescott, 2002)

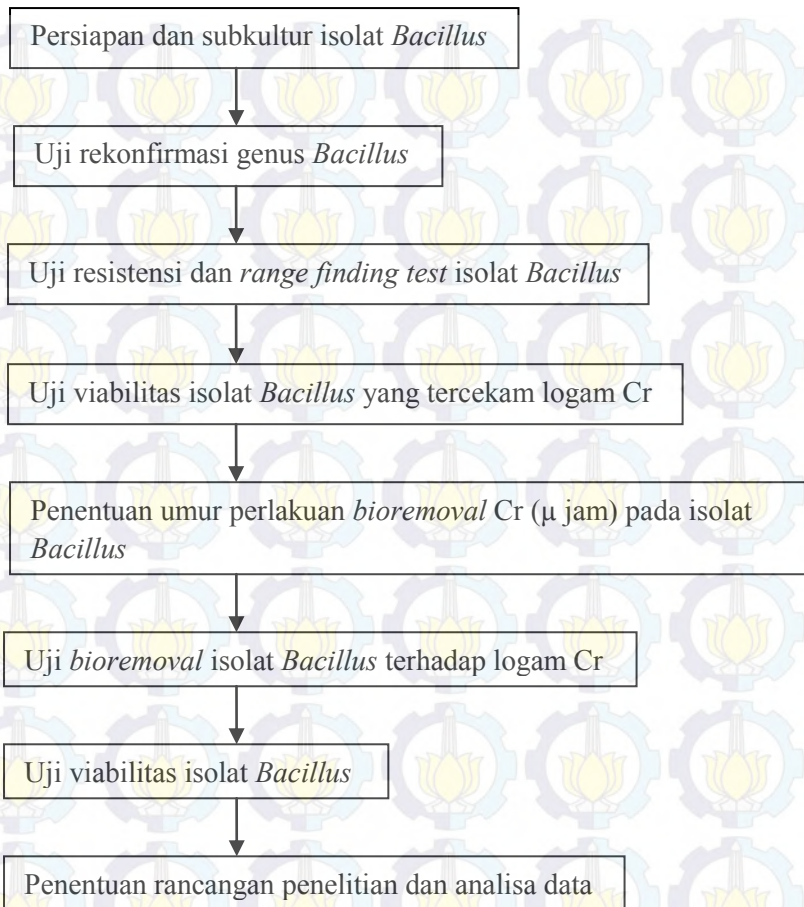
## Lampiran 2: Komposisi Medium NB

### **Komposisi Medium NB (pH 7.0)**

Peptone .....	5.0 gram
Beef extract .....	3.0 gram
Distilled water .....	1,000 ml
Diautoklaf dengan tekanan 121 lb selama 15 menit	

(Harley and Prescott, 2002)

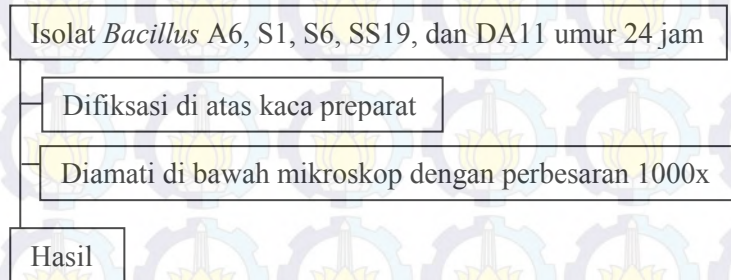
## Lampiran 3: Skema Kerja



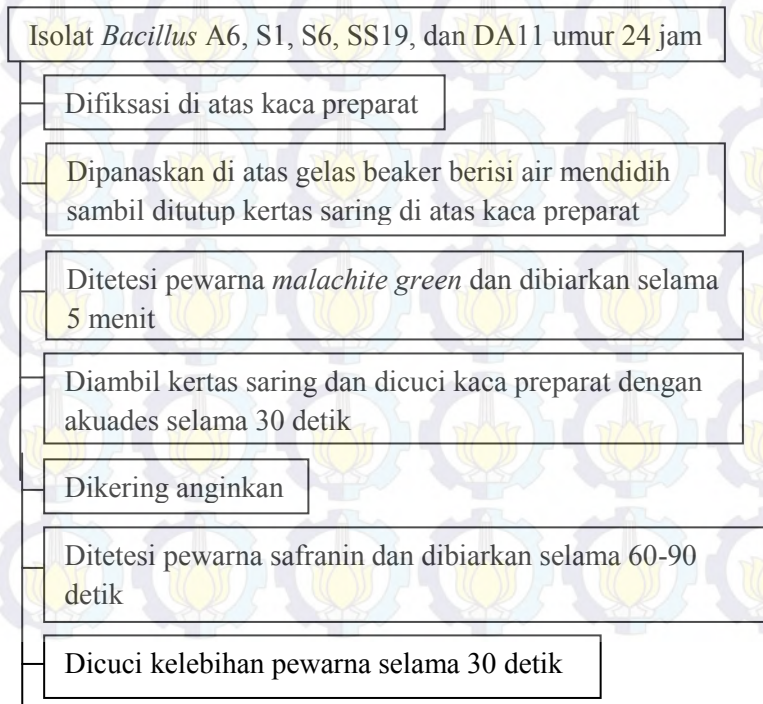


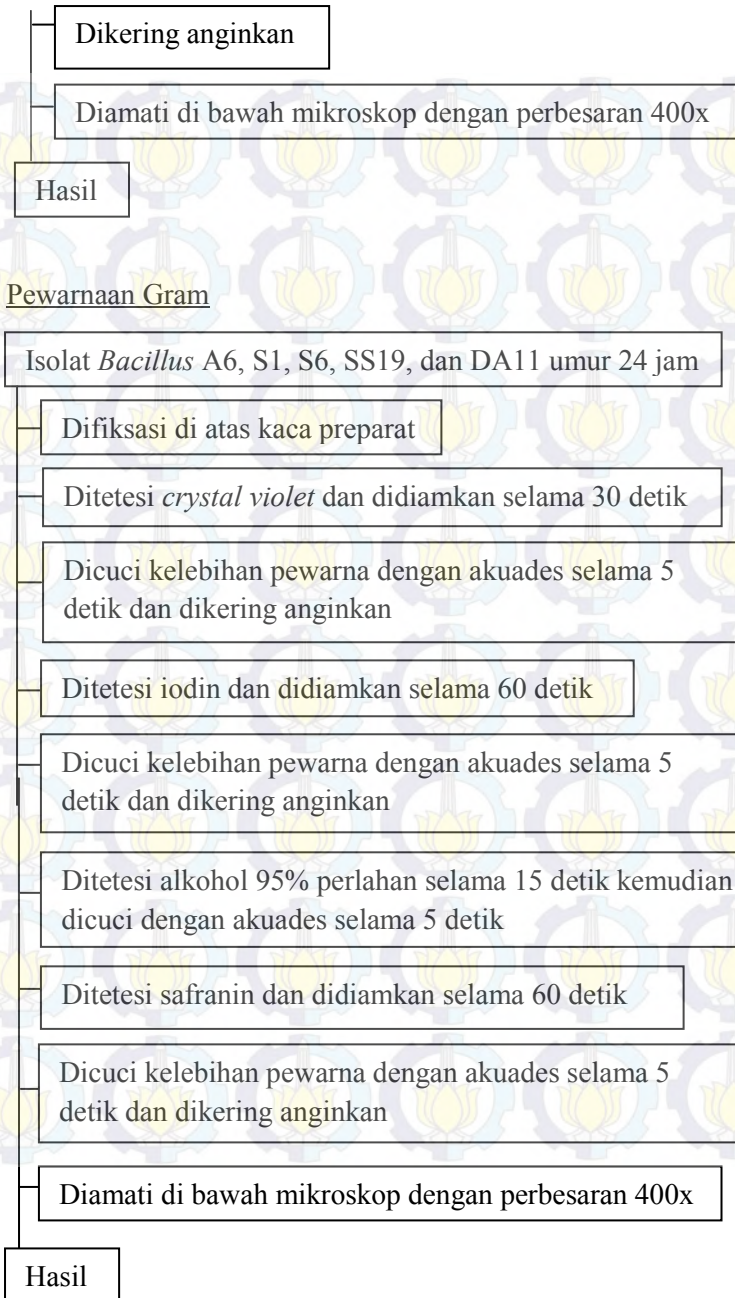
#### Lampiran 4: Skema Kerja Uji Rekonfirmasi

##### Pengamatan Morfologi

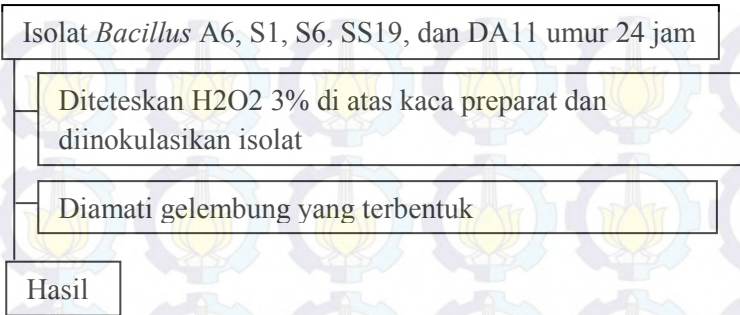


##### Pewarnaan Endospora

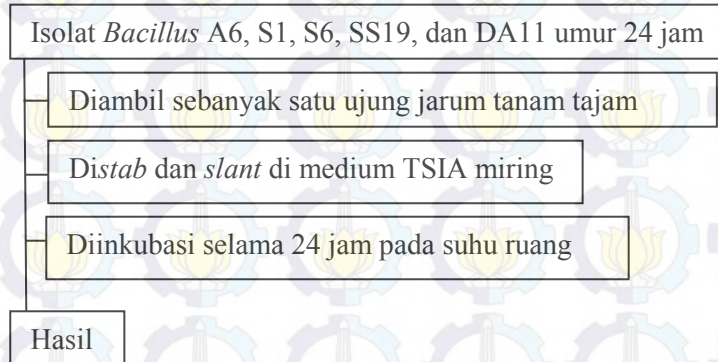




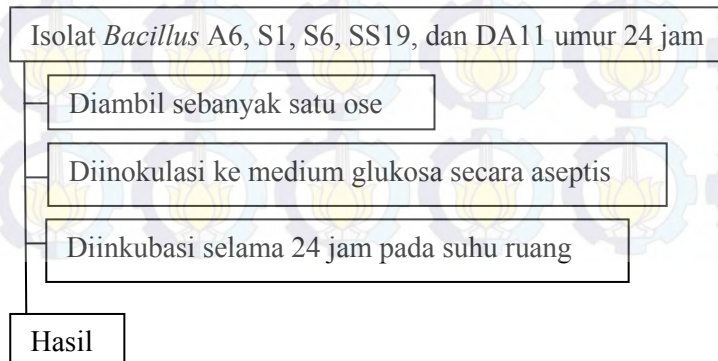
### Uji Katalase



### Uji Motilitas


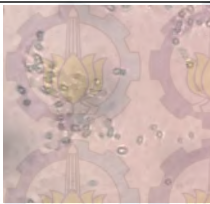
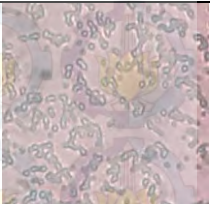



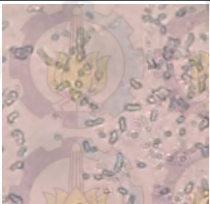
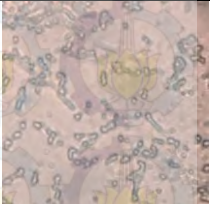
### Uji Fermentasi



Lampiran 5: Foto hasil uji rekonfirmasi

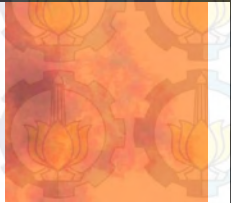
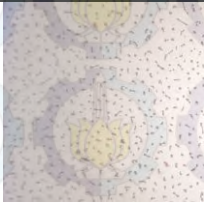
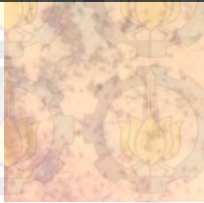
Pengamatan morfologi isolat *Bacillus*

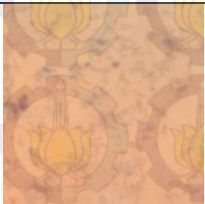

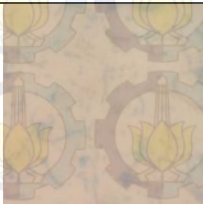
Isolat	A6	S1	S6
Gambar			

Isolat	SS19	DA11	<i>B.cereus</i> ATCC 1179
Gambar			


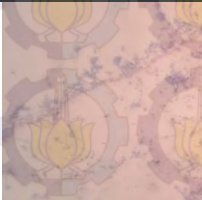
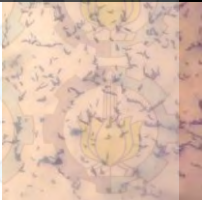


Pewarnaan endospora isolat *Bacillus*

Isolat	A6	S1	S6
Gambar			






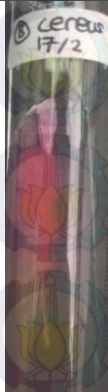
Isolat	SS19	DA11	<i>B.cereus</i> ATCC 1179
Gambar			

Pewarnaan Gram isolat *Bacillus*




Isolat	A6	S1	S6
Gambar			

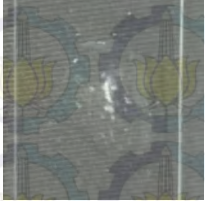

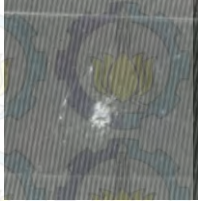
Isolat	SS19	DA11	<i>B.cereus</i> ATCC 1179
Gambar			

Uji motilitas isolat *Bacillus*

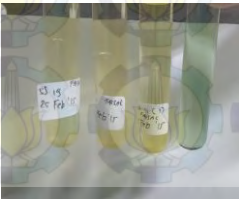
Isolat	A6	S1	S6	SS19	DA11	<i>B. cereus</i> ATCC1178
Gambar						

Uji katalase isolat *Bacillus*

Isolat	A6	S1	S6
Gambar			

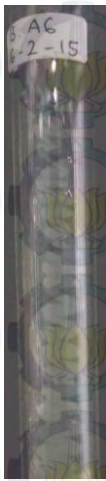





Isolat	SS19	DA11	<i>B.cereus</i> ATCC 1179
Gambar			

Uji Fermentasi Isolat *Bacillus* spp.





Lampiran 6: Hasil subkultur isolat *Bacillus*

Isolat	A6	S1	S6	SS19	DA11	<i>B. cereus</i> ATCC1178
Gambar						

Lampiran 7: Data pengukuran OD isolat *Bacillus* dalam media NB

S1	<i>B.cereus</i>	A6	SS19	DA11	S6	Jam-ke
0.012	0.016	0.066	0.064	0.007	0.102	0
0.021	0.053	0.107	0.100	0.038	0.083	
0.027	0.080	0.131	0.134	0.033	0.081	1
0.062	0.080	0.146	0.056	0.055	0.137	
0.067	0.114	0.117	0.058	0.020	0.262	3
0.146	0.151	0.213	0.163	0.001	0.265	4
0.325	0.336	0.353	0.308	0.048	0.323	6
0.435	0.437	0.464	0.327	0.138	0.467	8
0.490	0.450	0.465	0.380	0.353	0.489	10
0.493	0.519	0.533	0.415	0.505	0.422	12
0.530	0.530	0.576	0.406	0.546	0.433	14
0.580	0.763	0.630	0.403	0.569	0.578	16
0.601	0.783	0.669	0.492	0.597	0.522	18
0.628	0.784	0.681	0.535	0.676	0.531	20
0.655	0.802	0.680	0.533	0.658	0.584	22
0.658	0.827	0.692	0.558	0.713	0.591	24



Lampiran 9: Perhitungan umur perlakuan *bioremoval* ( $\mu$  jam) dan perhitungan jumlah sel/ml

Perhitungan Umur Perlakuan *Bioremoval* ( $\mu$  jam) Isolat *Bacillus*

$$\mu \text{ jam} = \frac{\text{fase eksponensial akhir} - \text{fase eksponensial awal}}{2} + \text{fase eksponensial awal} = \frac{18-6}{2} + 6 = 6 + 6 = 12$$

Jadi, umur perlakuan *bioremoval* isolat *Bacillus* adalah 12 jam.

Perhitungan Jumlah Sel/ml

$$\text{jumlah} \frac{\text{sel}}{\text{ml}} = \frac{\text{jumlah sel}}{0.02} \times 10^3$$

$$\text{jumlah} \frac{\text{sel}}{\text{ml}} \text{ isolat S1} = \frac{182}{0.02} \times 10^3 = 9.1 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{jumlah} \frac{\text{sel}}{\text{ml}} \text{ isolat SS19} = \frac{86}{0.02} \times 10^3 = 4.3 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{jumlah} \frac{\text{sel}}{\text{ml}} \text{ isolat DA11} = \frac{326}{0.02} \times 10^3 = 16.3 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$



Lampiran 10: Perhitungan pembuatan stok logam Cr 200 mg/L  
700 ml

$$\text{stok logam Cr} = \frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{x \text{ mg}}{700 \text{ ml}}$$

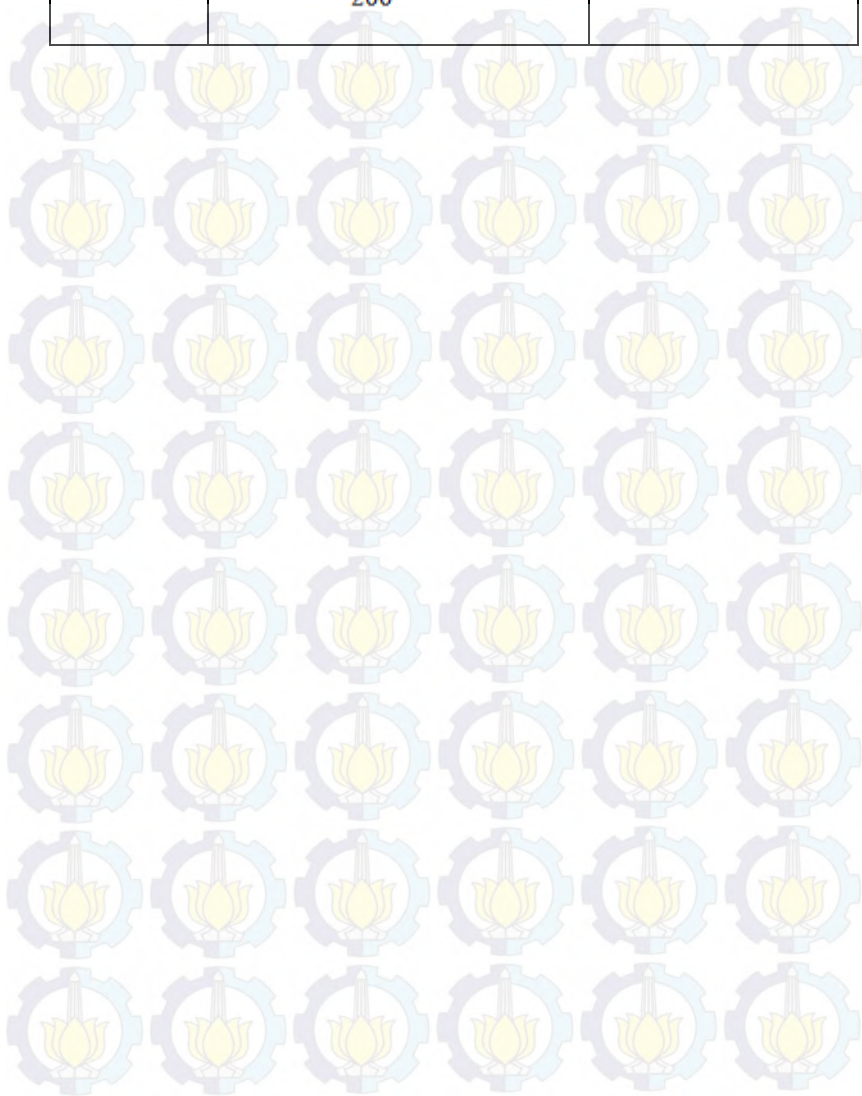
$$x = \frac{200 \times 70}{1000} = 140 \text{ mg K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$$

140 mg K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> ditambahkan akuades hingga volume 700 ml.

Lampiran 11: Perhitungan pembuatan medium NB-Cr @ 50 ml  
untuk *bioremoval*


Konsentrasi	Perhitungan Pengenceran Stok Logam Cr	NB yang Ditambahkan
50 mg/L	$M1 \times V1 = M2 \times V2$ $50 \times 50 = 200 \times V2$ $V2 = \frac{50 \times 50}{200} = 12.5 \text{ ml}$	37.5 ml
100 mg/L	$M1 \times V1 = M2 \times V2$ $100 \times 50 = 200 \times V2$ $V2 = \frac{100 \times 50}{200} = 25 \text{ ml}$	25 ml
150 mg/L	$M1 \times V1 = M2 \times V2$ $150 \times 50 = 200 \times V2$	12.5 ml

	$V_2 = \frac{150 \times 50}{200} = 37.5 \text{ ml}$	
--	---	--



## Lampiran 12: Hasil uji *bioremoval* logam Cr


 <b>KEMENTERIAN PERINDUSTRIAN REPUBLIK INDONESIA</b>		<b>BADAN PENGKAJIAN KEBIJAKAN IKLIM DAN MUTU INDUSTRI</b> <b>BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI SURABAYA</b> <b>LABORATORIUM PENGUJIAN DAN KALIBRASI</b> <b>BARISTAND INDUSTRI SURABAYA</b>		 <b>KAN</b> Komite Akreditasi Nasional LABORATORIUM PENGUJIAN LP-315-IDN	
Jl. Jagir Wonokromo No. 360 Surabaya (60244), Telp. (031) 8410054, (031) 70000034, Fax. (031) 8410480 <a href="http://surabaya.bpki.m.kemendin.go.id/">http://surabaya.bpki.m.kemendin.go.id/</a>					
<b>LAPORAN HASIL UJI</b> No. 1522/LHU/24/2015					
<b>UMUM/GENERAL</b>					
No. Analisa Analyse number	: P. 1816 a/d P. 1857				
Contoh Sample	: Medium NB				
Kode / Merk Code / Brand	: Tertampir				
Nama Pengirim Sender's Name	: ADISYA PRIMA NS				
Alamat Address	: Jambangan Indah III No. 34 SURABAYA – JAWA TIMUR				
Jenis Usaha Type of business	: -				
Petugas Pengambil Contoh Sampling Officer	: -				
Instansi Institute	: -				
Tanggal/Jam Pengambilan Contoh Date/time of sampling	: -				
Tanggal/Jam Diterima Laboratorium Date/time acceptance by laboratory	: 07 Mei 2015/16.00 WIB				
Lokasi Pengambilan Contoh Location of sampling	: -				
Acuan Metode Sampling Sampling method	: -				
<b>DATA INDUSTRI/INDUSTRIAL DATA</b>					
Debit Limbah Discharge of waste	: -				
Jumlah Produksi Number of production	: -				
Penggunaan bahan baku rata rata selama bulan pemantauan Average usage of raw materials during the monitoring month	: -				
<b>KEADAAN SAMPEL/SAMPLE CONDITION</b>					
pH contoh pada saat pengambilan pH on sampling time	: -				
Suhu contoh pada saat pengambilan Temperature on sampling time	: -				
Surabaya, 13 Mei 2015 Disetujui Penyelia Laboratorium Pengujian  Catur Wulandari N.ST NIP. 196402212005022001					
Hal. 1 dari 3 Page 1 of 3					
Catatan : Laporan Hasil Uji ini hanya berlaku untuk contoh diatas Laporan Hasil Uji ini tidak boleh digandakan ke pihak seluruhnya Kode Doc : TML-7.06 (G. 1/7)					



**Kementerian  
Perindustrian  
REPUBLIK INDONESIA**

**BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI SURABAYA**  
**LABORATORIUM PENGUJIAN DAN KALIBRASI**  
**BARISTAND INDUSTRI SURABAYA**

Jl. Jagir Wonokromo No. 360 Surabaya (60244), Telp. (031) 8410054, (031) 7000034, Fax. (031) 8410480  
<http://surabaya.bpkim.kemendperin.go.id/>



**Komite Akreditasi Nasional  
LABORATORIUM PENGUJIAN**  
LP-33-1008

---


**LAPORAN HASIL UJI**  
No. 1622/LHU/2V/2015

No. Analisa : P. 1816 s/d P. 1857  
 Contoh : Medium NB  
 Merk :  
 Diterima Tanggal : 07 Mei 2015  
 Catatan Sample : 50ml cairan dalam wadah botol plastik

Nama Pengirim : ADISYA PRIMA NS  
 Alamat : Jambangan Indah III No. 34  
 SURABAYA - JAWA TIMUR

No	No Analisa	Kode	Parameter Cr <sup>6+</sup> (mg/L)	Metode Uji
1	P.1816	B.S1.50. Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
2	P.1817	B.S1.100. Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
3	P.1818	B.S1.100. Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
4	P.1819	B. S1.50 Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
5	P.1820	B.S1.150 Cr	22.66	SNI 6989.71 : 2009
6	P.1821	B.S1.150 Cr	13.62	SNI 6989.71 : 2009
7	P.1822	B. SS19. 50 Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
8	P.1823	B. SS19. 50 Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
9	P.1824	B. SS19. 100 Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
10	P.1825	B. SS19. 100 Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
11	P.1826	B. SS19. 150 Cr	11.17	SNI 6989.71 : 2009
12	P.1827	B. SS19. 150 Cr	7.6	SNI 6989.71 : 2009
13	P.1828	B. DA11. 50 Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
14	P.1829	B. DA11. 50 Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
15	P.1830	B. DA11. 100 Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
16	P.1831	B. DA11. 100 Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
17	P.1832	B. DA11. 150 Cr	8.975	SNI 6989.71 : 2009
18	P.1833	B. DA11. 150 Cr	9.07	SNI 6989.71 : 2009
19	P.1834	K. 50. Cr.B	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
20	P.1835	K. 150. Cr.B	38.84	SNI 6989.71 : 2009
21	P.1836	K. 100. Cr.B	1.922	SNI 6989.71 : 2009
22	P.1837	A.A1a.25.Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
23	P.1838	A.A1a.25.Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
24	P.1839	A.A1a.50.Cr	1.33	SNI 6989.71 : 2009
25	P.1840	A.A1a.50.Cr	1.16	SNI 6989.71 : 2009
26	P.1841	A.A1a.75.Cr	12.04	SNI 6989.71 : 2009
27	P.1842	A.A1a.75.Cr	11.86	SNI 6989.71 : 2009
28	P.1843	A.A5.25.Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
29	P.1844	A.A5.25.Cr	< 0.0051	SNI 6989.71 : 2009
30	P.1845	A.A5.50.Cr	4.78	SNI 6989.71 : 2009



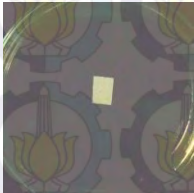
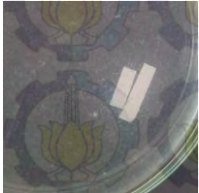

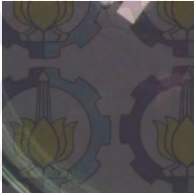
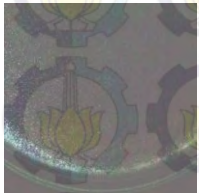

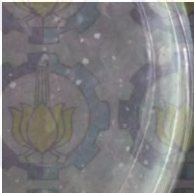
Disiapkan  
 Laporan Hasil Uji hanya berlaku untuk sampel diatas  
 Laporan Hasil Uji ini tidak boleh digunakan kembali seluruhnya  
 Utsa Dok FM - 7.09.02 110

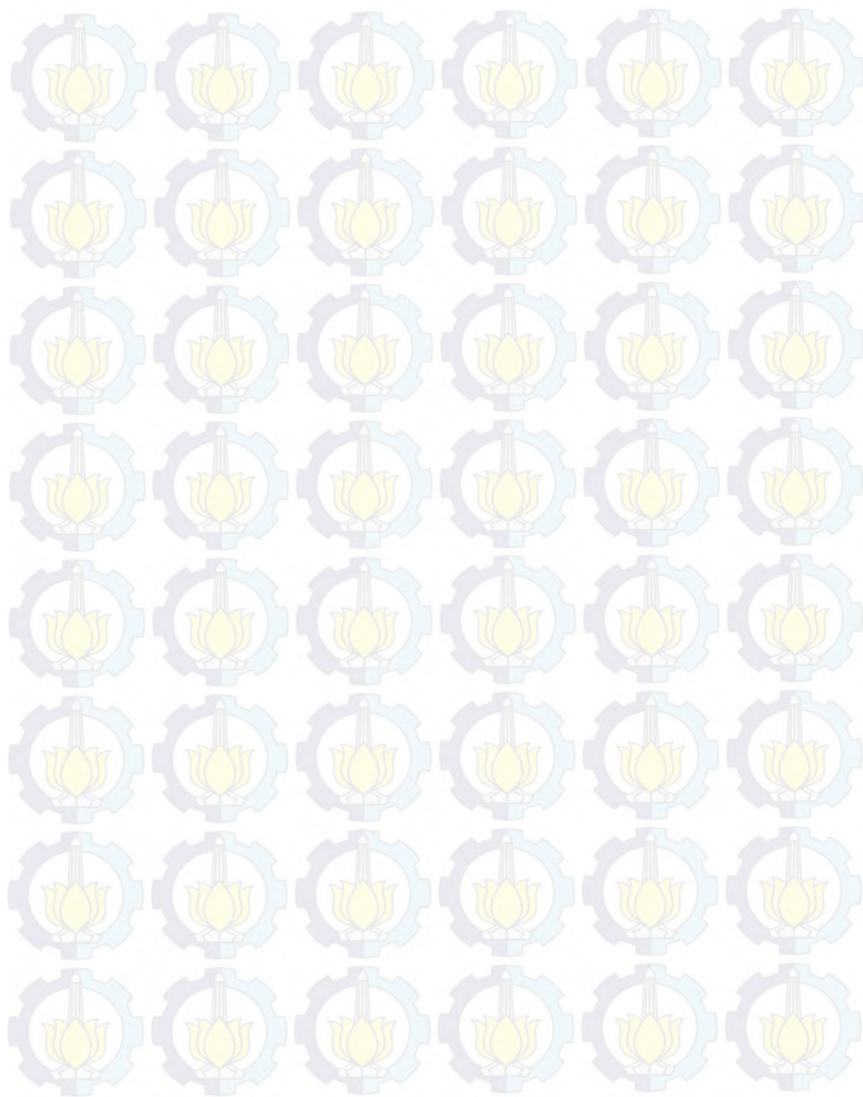


Halaman 2 dari 3 (Page 2 of 3)



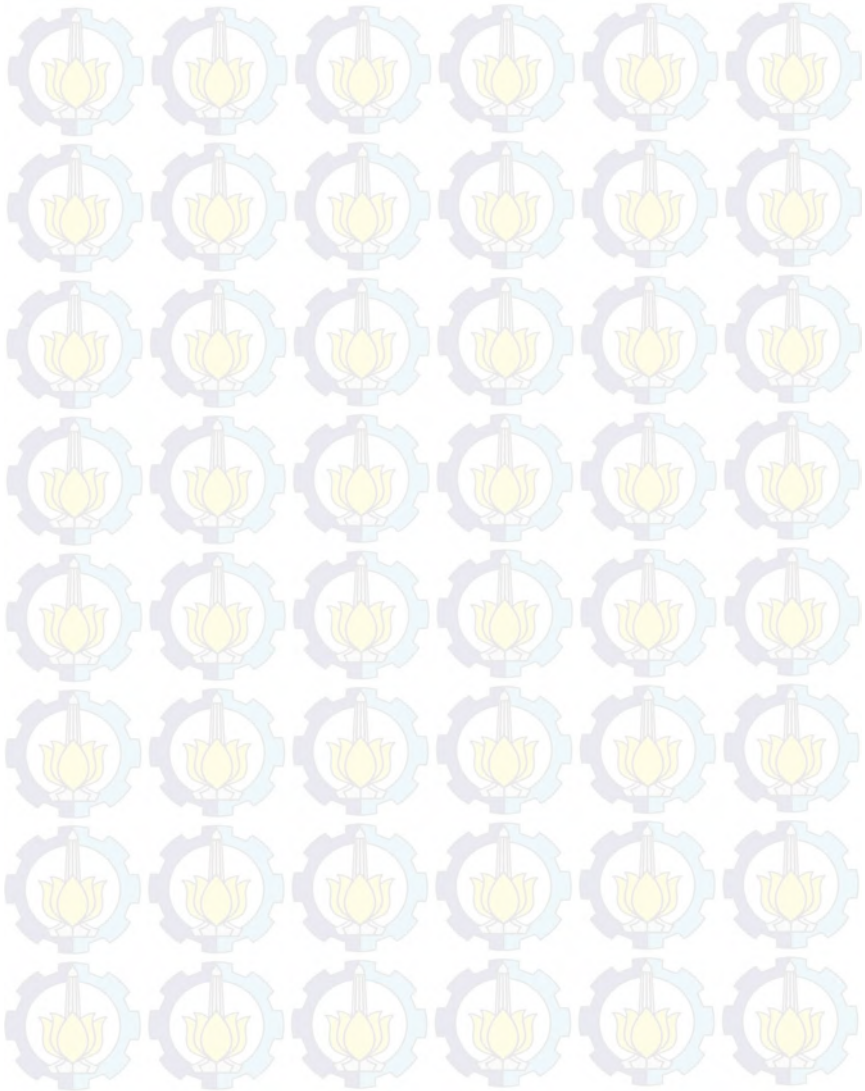
Lampiran 13: Hasil uji viabilitas isolat *Bacillus*

Isolat	Konsentrasi Cr yang Dipaparkan		
	50	100	150
S1			
SS19			
DA11			



## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Mekanisme Degradasi Cr.....	11
Gambar 4.1	Pertumbuhan Koloni <i>Bacillus</i> spp. dalam NA-Cr .....	22
Gambar 4.2	Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> S1.....	25
Gambar 4.3	Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> SS19.....	25
Gambar 4.4	Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> DA11 .....	26
Gambar 4.5	Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus cereus</i> ATCC 1178.....	27
Gambar 4.6	Pola Pertumbuhan <i>Bacillus</i> S1, SS19, dan DA11 dalam NB .....	29
Gambar 4.7	Persentase Efisiensi <i>Removal</i> Logam Cr oleh <i>Bacillus</i> spp.....	33





## BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Surabaya, 14 Januari 1993. Anak pertama dari tiga bersaudara pasangan Drs. Dwi Suryantoro Hadi dan Dra. Sri Umi Handari ini memulai pendidikan di TK Al-Huda Karah Agung, Surabaya yang kemudian dilanjutkan ke SDN Ketintang III/569 Surabaya. Setelah lulus, ia melanjutkan pendidikan ke SMPN 12 Surabaya dan SMAN 2 Surabaya. Kemudian, penulis melanjutkan pendidikan di Jurusan Biologi FMIPA ITS.

Sejak SMA, penulis ingin bergabung dalam tim redaksi suatu majalah. Hal tersebut yang mendorongnya untuk berpartisipasi menjadi salah satu anggota redaktur majalah BIOGONAL. Di sini, penulis bertindak sebagai editor utama. Beberapa artikelnya pernah dipublikasikan dalam majalah BIOGONAL, yaitu “Biorock, Metode Ampuh Rehabilitasi Terumbu Karang” dan “Menyingkap Tabir Rahasia Pulau Moyo”. Selain itu, penulis juga pernah menjadi peserta Youth Educators Regional Training tahun 2012 di Lawang, Malang sebagai salah satu bukti kepeduliannya terhadap dunia pendidikan. Penulis juga menjadi salah satu anggota Surveyor Laboratorium Ekologi, Jurusan Biologi ITS.

Penulis tergabung dalam tim Riset Bioremediasi dan Biofertilizer bimbingan Dr. Enny Zulaika, MP. untuk Tugas Akhirnya. Penulis juga pernah menjadi *paper presenter* dalam International Biology Conference 2014 yang diadakan oleh Jurusan Biologi ITS, mempresentasikan *paper* yang berjudul “*Bacillus* S1 as A Potential Mercury ( $Hg^{2+}$ ) Reducing and Organic Compound Degradation Agent”.



# Viabilitas *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 pada Medium yang Terpapar Logam Kromium (Cr)

Adisya P. N. Sari dan Dr. Enny Zulaika, MP.

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh

Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: enny@bio.its.ac.id

**Abstrak**— Kromium (Cr) tergolong logam berat yang dapat masuk ke lingkungan melalui limbah industri sehingga mencemari lingkungan. Telah diketahui terdapat bakteri resisten Cr yang diisolasi dari limbah yang mengandung logam Cr. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui resistensi dan viabilitas *Bacillus* yang tercekam Cr. Uji resistensi *Bacillus* dilakukan pada medium *nutrient agar* yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L. Uji viabilitas *Bacillus* dilakukan pada 3 isolat yang dipilih dari uji resistensi. Isolat tersebut dikategorikan lebih resisten dari isolat yang lain. Uji viabilitas dilakukan pada media *nutrient broth* yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  50, 100, dan 150 mg/L. Kepadatan sel diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan isolat *Bacillus* resisten pada medium *nutrient agar* yang mengandung logam Cr pada konsentrasi  $\leq 250$  mg/L. Pola pertumbuhan isolat *Bacillus* yang tercekam logam Cr relatif lebih rendah dibandingkan kontrol. Semakin tinggi konsentrasi Cr yang digunakan, semakin rendah pola pertumbuhan *Bacillus*.

**Kata Kunci**—*Bacillus*, kromium (Cr), resistensi, viabilitas.

## I. PENDAHULUAN

LOGAM berat adalah suatu istilah yang digunakan untuk sekelompok logam dan metaloid dengan densitas atom lebih dari  $5\text{g/cm}^3$ , sebagian besar bersifat toksik, tidak dapat didegradasi [1], sehingga selalu ada di lingkungan dalam keadaan persisten [2]. Salah satu logam berat yang berbahaya adalah kromium (Cr) [3], walaupun Cr dalam konsentrasi yang rendah [4].

Sebagian besar introduksi kromium ke lingkungan diakibatkan oleh kegiatan antropogenik. Kromium telah banyak digunakan dalam berbagai macam industri, seperti industri penyamakan kulit, *electroplating* [5], serta industri cat dan tekstil [6]. Penggunaan kromium yang semakin meluas dan tidak diimbangi dengan pengolahan limbah industri yang baik menyebabkan limbah industri yang mengandung kromium akan dilepas begitu saja ke lingkungan [2], sehingga dapat mencemari lingkungan.

Beberapa bakteri resisten terhadap kromium, di antaranya *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Deinococcus*, *Shewanella*, *Agrobacterium*, *Escherichia*, dan *Thermus* [7]. Mekanisme resistensi bakteri terhadap logam Cr antara lain melalui mekanisme reduksi Cr (VI) ekstraseluler dan intraseluler, pengurangan penyerapan melalui jalur sulfat, dan pompa Cr(VI) [8]. Bakteri anggota genus *Bacillus* dapat melakukan *bioremoval* terhadap logam

Cr dengan menurunkan valensi dari Cr VI menjadi Cr III sehingga toksisitas logam Cr tersebut menjadi berkurang [5].

Merkuri dan kromium adalah logam berat yang bersifat toksik walaupun dalam konsentrasi sangat rendah [9]. Isolat *Bacillus* merupakan bakteri yang diisolasi dari Sungai Kalimas Surabaya, telah diketahui merupakan bakteri resisten merkuri [10], dan secara enzimatik mampu menurunkan kadar merkuri dari media kulturnya [11]. Selain itu, isolat tersebut juga diketahui resisten terhadap logam Hg, Cd, Pb, dan Cu [12]. Isolat *Bacillus* belum diketahui resistensi dan viabilitas ketika tercekam logam Cr sehingga diharapkan isolat *Bacillus* juga resisten terhadap kromium.

## II. METODOLOGI PENELITIAN

### A. Uji Resistensi Isolat *Bacillus* Terhadap $K_2Cr_2O_7$

Isolat *Bacillus* umur 24 jam dengan kode S1, S6, SS19, DA11, A6, dan *Bacillus cereus* ATCC 1178 sebagai kontrol ditumbuhkan di pada media *nutrient agar*- $K_2Cr_2O_7$  dengan metode *continue streak plate*. Konsentrasi  $K_2Cr_2O_7$  yang digunakan adalah 0.1 ppm. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap  $K_2Cr_2O_7$ . Uji resistensi dilanjutkan dengan konsentrasi Cr 50 mg/L sampai 300 mg/L. Koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap logam Cr.

### B. Uji Viabilitas Isolat *Bacillus* yang Tercekam $K_2Cr_2O_7$

Satu ose isolat diinokulasi secara aseptik ke dalam 20 ml media *nutrient broth* yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  dengan konsentrasi 50, 100, dan 150 mg/L dan diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker*. Sebanyak 20 ml kultur ditambahkan ke dalam 180 ml media *nutrient broth* dengan konsentrasi Cr 50, 100, dan 150 mg/L dan diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker*. Kepadatan sel diukur *optical density* (OD)nya dengan spektrofotometer UV-Vis ( $\lambda = 600$  nm). Pengukuran OD dilakukan setiap setengah jam dari jam ke-0 sampai dengan jam ke-4, setelah jam ke-4 dilakukan pengukuran setiap 2 jam. Data pengukuran OD ditampilkan dalam bentuk kurva dengan sumbu x sebagai waktu pengukuran dan sumbu y sebagai nilai OD yang didapat.



### III. HASIL DAN DISKUSI

#### A. Resistensi dan *Bacillus* Terhadap $K_2Cr_2O_7$

Uji resistensi dilakukan untuk mengetahui kemampuan resistensi isolat *Bacillus* pada medium yang mengandung logam berat Cr. Hasil uji resistensi menunjukkan bahwa isolat dapat tumbuh pada medium yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  sampai dengan konsentrasi 300 mg/L. Semua isolat dapat tumbuh dengan baik karena pertumbuhan koloni mengikuti pola *streak* yang dibuat secara penuh (Tabel 1).

Tabel 1.

Isolat <i>Bacillus</i>	Resistensi <i>Bacillus</i> Terhadap $K_2Cr_2O_7$						
	Pertumbuhan isolat <i>Bacillus</i> spp. pada medium yang mengandung $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)						
	0.1	50	100	150	200	250	300
A6	+++	+++	+++	++	++	+	+
DA11	+++	+++	+++	++	++	++	++
S1	+++	+++	+++	++	++	++	++
S6	+++	+++	+++	++	++	+	+
SS19	+++	+++	+++	++	++	++	++
<i>B. cereus</i>	+++	+++	+++	++	++	++	++

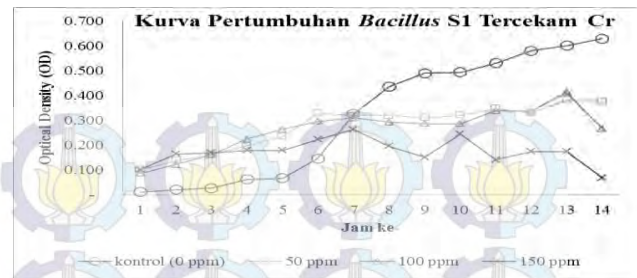
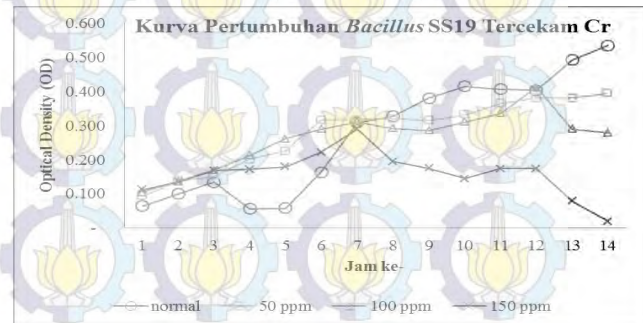
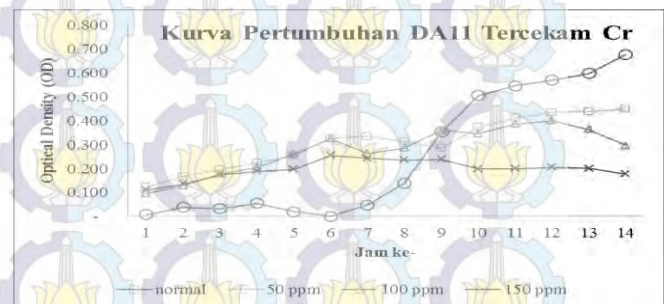
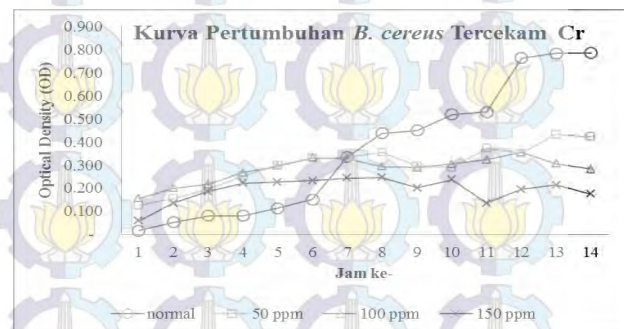
Koloni *Bacillus* dapat tumbuh dengan baik pada medium yang mengandung logam Cr pada konsentrasi  $\leq 100$  mg/L, dan kemampuan pertumbuhan koloni isolat *Bacillus* mengalami penurunan seiring dengan meningkatnya konsentrasi logam Cr dalam medium. Koloni *Bacillus* tumbuh cukup baik pada konsentrasi 150 - 300 mg/L, kecuali koloni isolat A6 dan S6 yang tumbuh kurang baik pada konsentrasi 250 dan 300 mg/L.

Mekanisme resistensi *Bacillus* diatur oleh operon *chlA1* dan gen *chrA* yang diduga merupakan transpoter Cr(VI). Operon *chlA1* dan gen *chrA* telah diketahui merupakan *inducible genes*, yaitu gen yang akan terekspresi dalam kondisi tertentu. Adanya penambahan Cr ke dalam medium pertumbuhan menyebabkan aktifnya gen *chrA*. Ekspresi dari kedua gen tersebut adalah suatu protein transporter (*chrA1*) yang dapat mengeluarkan kromat dari dalam sel menggunakan *proton-motive force* sehingga *chrA1* bertanggung jawab terhadap sifat resistensi *Bacillus* terhadap Cr [13].

Berdasarkan hasil uji resistensi tersebut dipilih tiga isolat yang lebih resisten dibandingkan isolat lain, yaitu *Bacillus* S1, SS19 dan DA11. Konsentrasi  $K_2Cr_2O_7$  yang dipilih (*range finding test*) adalah tiga konsentrasi di bawah konsentrasi maksimal, yaitu 50, 100, dan 150 ppm.

#### B. Viabilitas Isolat *Bacillus* yang Tercekam $K_2Cr_2O_7$

Pola pertumbuhan *Bacillus* yang tercekam logam Cr digunakan untuk mengetahui daya hidup isolat uji pada media *nutrient broth* yang terpapar logam  $K_2Cr_2O_7$  dengan konsentrasi 50, 100, dan 150 mg/L. Daya hidup isolat uji dapat dilihat dari pola pertumbuhan pada Gambar 1 sampai Gambar 4.

Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Bacillus* S1Gambar 2. Kurva pertumbuhan *Bacillus* SS19Gambar 3. Kurva pertumbuhan *Bacillus* DA11Gambar 4. Kurva pertumbuhan *Bacillus cereus* ATCC 1178

Berdasarkan pola pertumbuhan pada Gambar 1 sampai 4, isolat *Bacillus* menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama. Pertumbuhan semua isolat yang tercekam logam lebih rendah dibanding kontrol (media tanpa logam). Semua isolat menunjukkan pola pertumbuhan yang relatif rendah pada konsentrasi 150 mg/L dibanding konsentrasi 50 dan 100 mg/L.

Secara umum tidak terjadi fase lag pada kurva pertumbuhan masing-masing kultur *Bacillus* yang tercekam logam. Kurva pertumbuhan semua kultur langsung memasuki fase log sejak pengukuran OD jam ke-0. Isolat *Bacillus* yang digunakan telah diuji resistensinya terhadap logam Cr, dengan hasil uji semua isolat *Bacillus* mampu tumbuh dengan baik pada media *nutrient agar* 300 mg/L (Tabel 1), sehingga semua isolat ketika dikultur pada medium *nutrient broth* yang mengandung Cr dengan



konsentrasi di bawah 300 mg/L tidak perlu lagi beradaptasi dan langsung memasuki fase log.

Kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* yang tercekam logam Cr menunjukkan nilai OD paling tinggi berkisar 0,4, baik S1, SS19, DA11, maupun *Bacillus cereus* ATCC 1178 sebagai kontrol. Nilai tersebut lebih rendah dibandingkan dengan nilai OD isolat *Bacillus* yang dikultur pada medium tanpa penambahan logam Cr, dengan nilai OD 0,5 – 0,7. Nilai OD juga semakin lebih rendah seiring meningkatnya konsentrasi logam Cr yang ditambahkan dalam medium. Penurunan nilai OD paling signifikan terlihat pada kultur yang ditumbuhkan pada medium *nutrient broth* yang mengandung Cr konsentrasi 150 mg/L. Kultur yang ditumbuhkan dalam medium *nutrient broth* yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  konsentrasi 50 dan 100 mg/L hampir tidak berbeda, antara kultur S1, SS19, DA11, dan *B. cereus* ATCC 1178 sebagai control positif. Hal ini menunjukkan bahwa logam  $K_2Cr_2O_7$  pada konsentrasi 50, 100, dan 150 mg/L memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan isolat *Bacillus*.

Semua kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* yang terpapar kromium menunjukkan pola pertumbuhan yang lebih rendah dibanding kontrol. Adanya perbedaan pola pertumbuhan antara kultur yang ditumbuhkan pada medium tanpa logam Cr dengan kultur pada medium yang ditambah logam Cr mengindikasikan efek toksik Cr terhadap pertumbuhan sel terjadi selama 24 jam masa inkubasi [14]. Efek toksik tersebut berkaitan dengan adanya perubahan materi genetik dan reaksi fisiologis serta metabolisme *Bacillus*. [15]-[14]. Mikroorganisme yang terpapar kromium dalam jangka waktu lama dapat menurunkan diversitas mikrobia, populasi, dan aktivitas mikroorganisme tersebut [16].

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

- 1) Isolat *Bacillus* S1, SS19, dan DA11 resisten terhadap kromium pada media *nutrient agar*-kromium konsentrasi  $\leq 250$  ppm.
- 2) Pola pertumbuhan *Bacillus* S1, SS19, DA11 dan *Bacillus cereus* yang ditumbuhkan di medium *nutrient broth* tanpa  $K_2Cr_2O_7$  relatif lebih tinggi dibandingkan pola pertumbuhan *Bacillus* yang ditumbuhkan di medium *nutrient broth*- $K_2Cr_2O_7$ .

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis A.P.N.S. mengucapkan terima kasih kepada Dr. Enny Zulaika, MP melalui pendanaan penelitian dari PNBP ITS tahun anggaran 2015 sesuai nomor kontrak 003246.IT2.11/PN.08/2015

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] J. P. Chen, *Decontamination of Heavy Metals: Process, Mechanisms, and Applications*. Florida: Taylor & Francis Group (2012).
- [2] R. S. Laxman and S. More, "Reduction of Hexavalent Chromium by *Streptomyces griseus*," *Mineral Engineering*, Vol 15 (2002) 831-837.
- [3] L. Velasques and J. Dussan, "Biosorption and Bioaccumulation of Heavy Metals on Dead and Living Biomass of *Bacillus sphaericus*," *Journal of Hazard. Materials*, Vol. 167 (2009) 713-716.
- [4] J. O. Nriagu and E. Neiboer, *Chromium In The Natural and Human Environments*. Canada: John Wiley and Sons, Inc. (1998).
- [5] L. Yun-guo, F. Bao-ying, F. Ting, Z. Hai-zhou, and L. Xin, "Tolerance and Removal of Chromium (VI) by *Bacillus* sp. Strain YB-1 Isolated from Electroplating Sludge," *Trans Nonferrous Met. Soc. China*, Vol 18 (2008) 480-487.
- [6] H. Tian-pei, X. Ying, P. Jie-ru, C. Zhi, L. L. Fen, X. Lei, Z. Ling-ling, and G. Xiong, "Aerobic Cr(VI) Reduction by An Indegenous Soil Isolate *Bacillus thuringiensis* BRC-ZYR2," *Pedosphere*, Vol. 24 (2014) 652-661.
- [7] H. Ohtake, C. Cervantes, and S. Silver, "Decreased Chromate Uptake in *Pseudomonas fluorescens* Carrying A Chromate Resistance Plasmid," *Journal of Bacteriology* (1987, Aug) 3853-3856.
- [8] H. Thatoi, S. Das, J. Mishra, B. P. Rath, and N. Das, "Bacterial Chromate Reductase, A Potential Enzyme for Bioremediation of Hexavalent Chromium; A Review," *Environmental Management*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014> (2014).
- [9] P. Govind and S. Madhuri, "Heavy Metals Causing Toxicity in Animals and Fishes," *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*, Vol. 2 (2014) 17-23.
- [10] E. Zulaika, L. Sembiring and A. Soegianto, "Characterization and Identification of Mercury-resistant Bacteria from Kalimas River Surabaya-Indonesia by Numerical Phenotic Taxonomy," *Journal Basic and Applied Science Res.*, Vol. 2 (2012) 7263-7269.
- [11] E. Zulaika and L. Sembiring, "Indegenous Mrcry Resistant Bacterial Isolates Belong to The Genus *Bacillus* from Kalimas Surabaya As A Potential Mercury Bioreducer," *Journal Applied Environmental Biological Sciences*, Vol. 4 (2014) 72-76.
- [12] E. Zulaika, A. Luqman, T. Arindah, dan U. Sholikah, "Bakteri Resisten Logam Berat yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator," in *Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development*, (2012, Feb).
- [13] M. He, X. Li, L. Guo, S. J. Miller, C. Rensing, and G. Wang, "Characterization and Genomic Analysis of Chromate Resistant and Reducing *Bacillus cereus* strain SJ1," *BMC Microbiology*, Vol. 10 (2010) 221.
- [14] G. Cheng and X. Li, "Bioreduction of Chromium (VI) by *Bacillus* sp. Isolated from Soils of Iron Mineral Area," *European Journal of Soil Biology*, Vol. 45(2009) 483-487.
- [15] M. E. Losi, C. Amrhein, W. T. Frankenberger, "Environmental Biochemistry of Chromium," *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 36(1994) 91-121.
- [16] S. Basu, M. Dasgupta, and B. Chakraborty, "Removal of Chromium (VI) by *Bacillus subtilis* Isolated from East Calcutta Wetlands, West Bengal, India," *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Vol. 14(2014) 7-10.



Tugas Akhir - SB141510

# RESISTENSI DAN POTENSI *Bacillus* spp. SEBAGAI BIOREMOVAL LOGAM KROMIUM (Cr)

Adisya Prima Nurmawati Sari

1511 100 076

Dosen Penguji:

1. Aunurohim, S. Si., DEA : Penguji I dan Ketua Sidang
2. Nur Hidayatul Alami, S. Si., M. Si. : Penguji II
3. Dr. Enny Zulaika, MP. : Penguji III dan Pembimbing





# Outline

Pendahuluan

Metodologi

Hasil

Kesimpulan







# PENDAHULUAN



# Latar Belakang



Cr tergolong logam berat yang toksik, walaupun dalam konsentrasi rendah

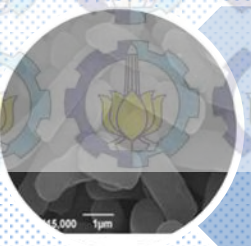
(Velasques & Dunsen, 2009; Nriagu & Nieboer, 1998)



Cr banyak digunakan dalam industri tanpa pengolahan limbah yang baik (Yun-guo *et al.*, 2008; Laxman & More, 2001)

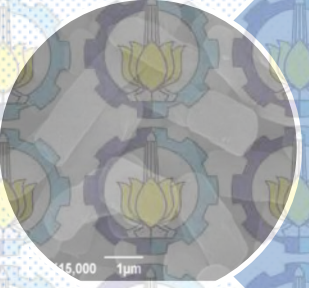


Cr(VI) yang terlepas ke lingkungan bersifat karsinogenik (Yun-guo *et al.*, 2008)



Beberapa bakteri diketahui resisten terhadap Cr(VI), antara lain *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Deinococcus*, *Shewanella*, *Agrobacterium*, *Escherichia*, dan *Thermus* (Ohtake *et al.*, 1987).





Isolat *Bacillus* spp. diketahui resisten terhadap merkuri (Zulaika *et al.*, 2012), dan secara enzimatik mampu menurunkan kadar merkuri dari media kulturnya (Zulaika and Sembiring, 2014)



Isolat *Bacillus* spp. belum diketahui resistensi dan kemampuan bioremovalnya terhadap logam Cr





# Permasalahan

1. Apakah semua isolat *Bacillus* spp. juga resisten terhadap logam berat kromium?
2. Jika resisten, bagaimana potensi isolat tersebut dalam meremoval logam Cr?

## Batasan Masalah

1. Isolat yang digunakan untuk uji resistensi adalah isolat *Bacillus* spp. kode isolat A6, S1, S6, SS19, DA11, dan *Bacillus cereus* ATCC 1178
2. Kromium yang digunakan senyawa potasium dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ), salah satu bentuk Cr valensi VI
3. Konsentrasi Cr VI dianalisis dengan AAS  $\lambda = 357.9$  nm (Monteiro *et al.*, 2002)
4. Konsentrasi Cr yang digunakan untuk uji *bioremoval* sesuai *range finding test*



# Tujuan

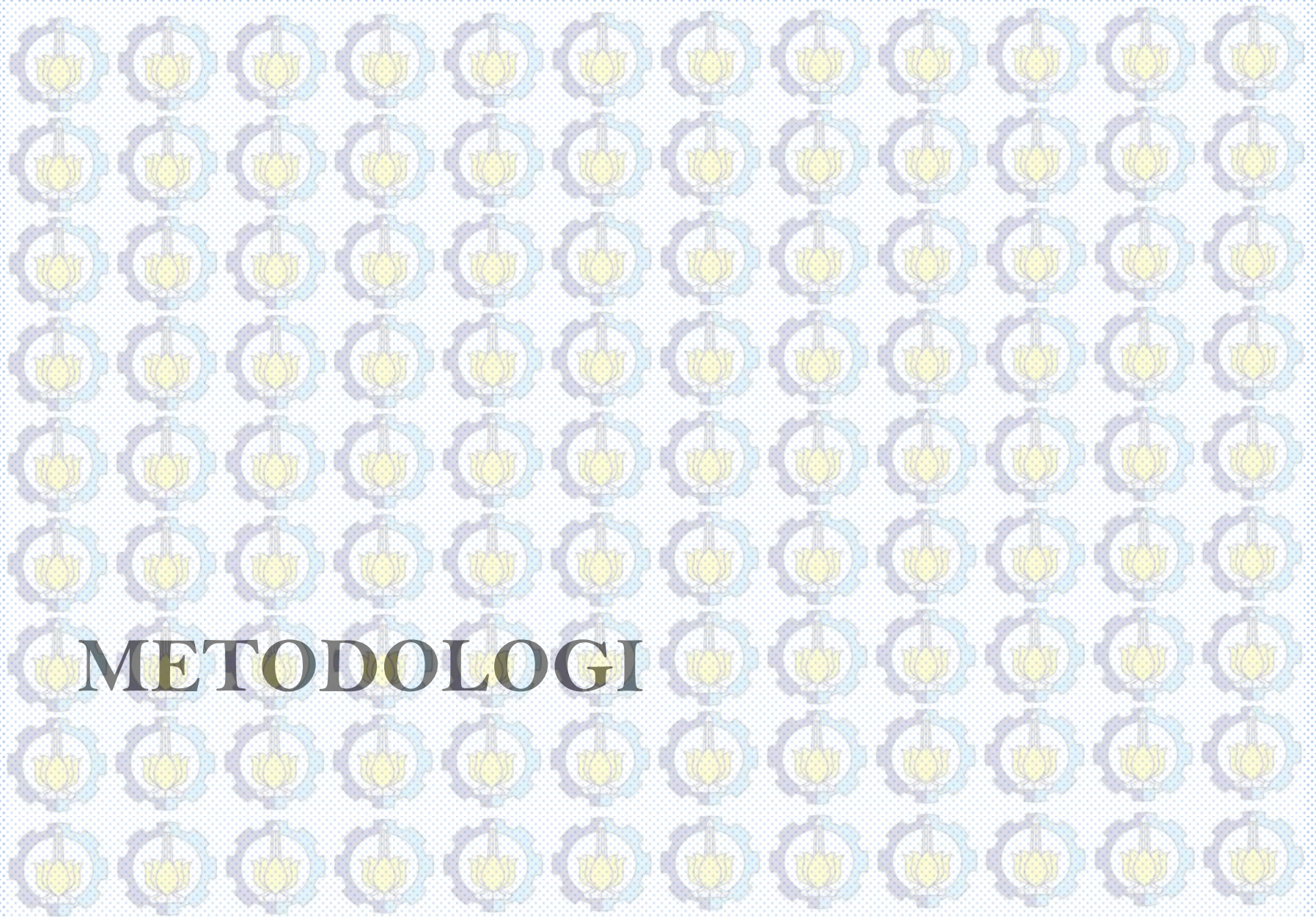
1. Mendapatkan isolat *Bacillus* yang resisten terhadap Cr
2. Mengetahui kemampuan *Bacillus* dalam melakukan bioremoval terhadap logam Cr

# Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan mendapat isolat *Bacillus* yang dapat dimanfaatkan sebagai agen bioremoval logam Cr dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen bioremediasi lahan tercemar Cr yang ramah lingkungan







# METODOLOGI



Persiapan dan subkultur isolat *Bacillus*

Uji rekonfirmasi genus *Bacillus*

Uji resistensi dan *range finding test* isolat *Bacillus*

Uji viabilitas isolat *Bacillus* yang tercekam logam Cr

Penentuan umur perlakuan *bioremoval* Cr ( $\mu$  jam) pada isolat *Bacillus*

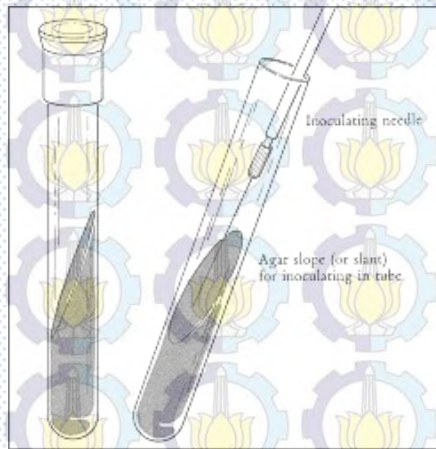
Uji *bioremoval* isolat *Bacillus* terhadap logam Cr

Uji viabilitas isolat *Bacillus*

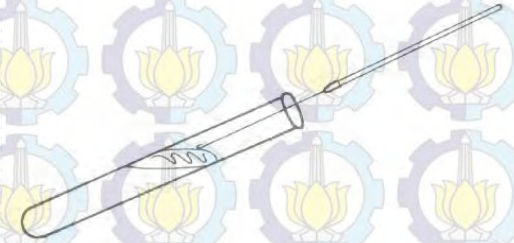
Penentuan rancangan penelitian dan analisa data



# Persiapan dan Subkultur Isolat *Bacillus* spp.



Diinokulasi  
secara aseptis



Stok kultur A6,  
S1, S6, SS19,  
DA11, *Bacillus*  
*cereus* ATCC 1178

Diinkubasi  
selama 24 jam  
suhu ruang

Isolat yang tumbuh



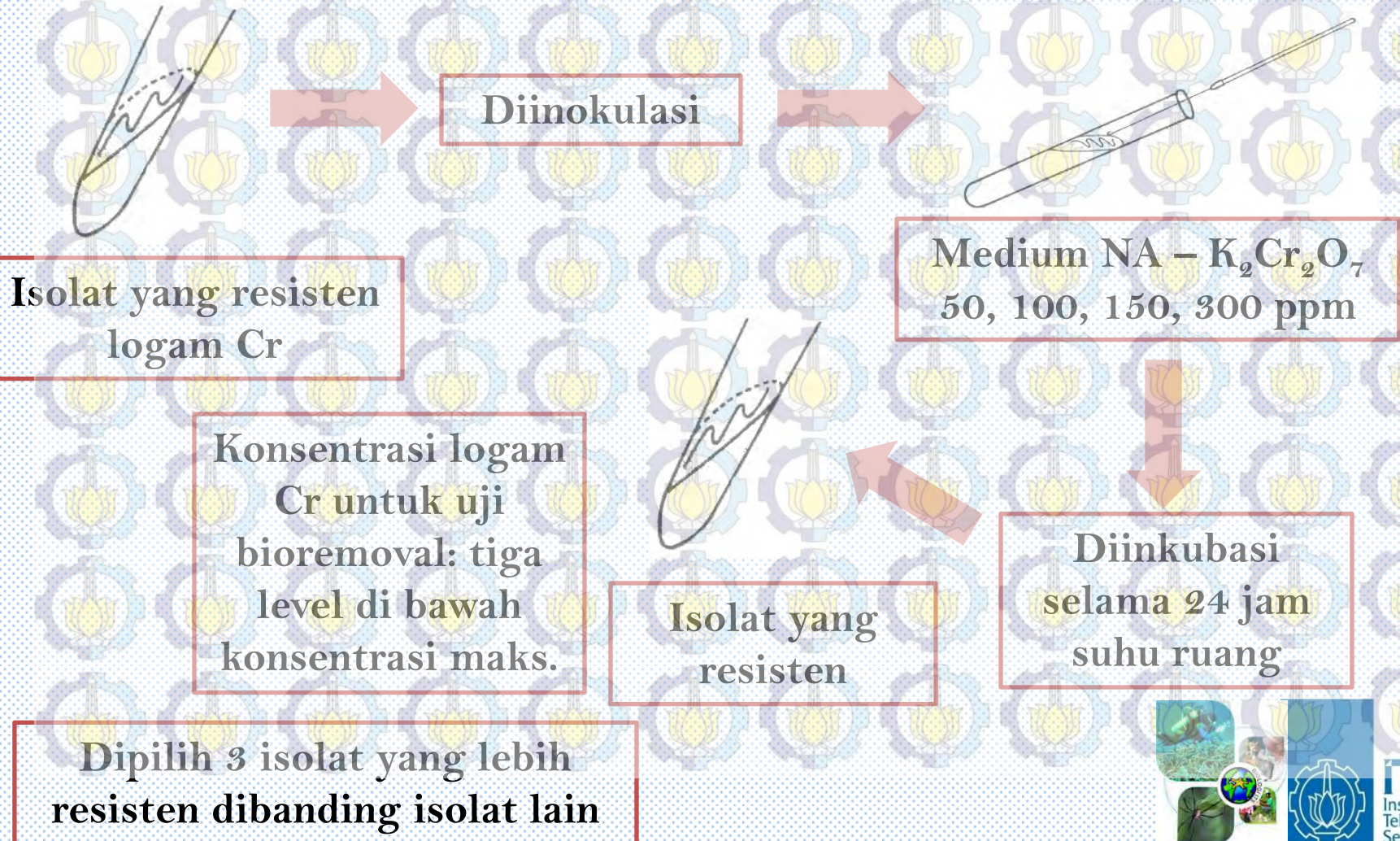


# Uji Resistensi *Bacillus* Terhadap Logam Cr



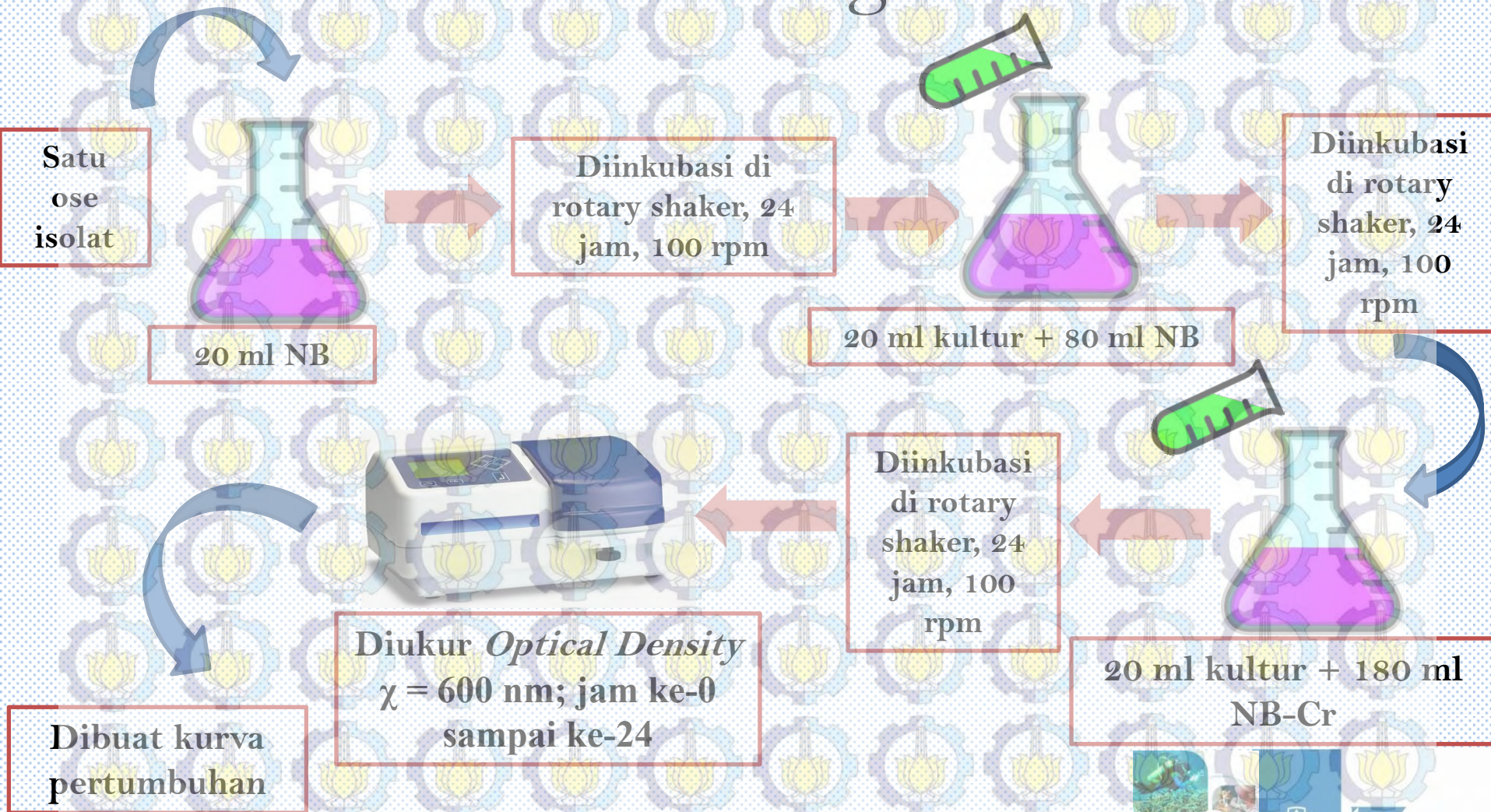


# *Range Finding Test Bacillus Terhadap Logam Cr*





# Uji Viabilitas Isolat *Bacillus* yang Tercekam Logam Cr

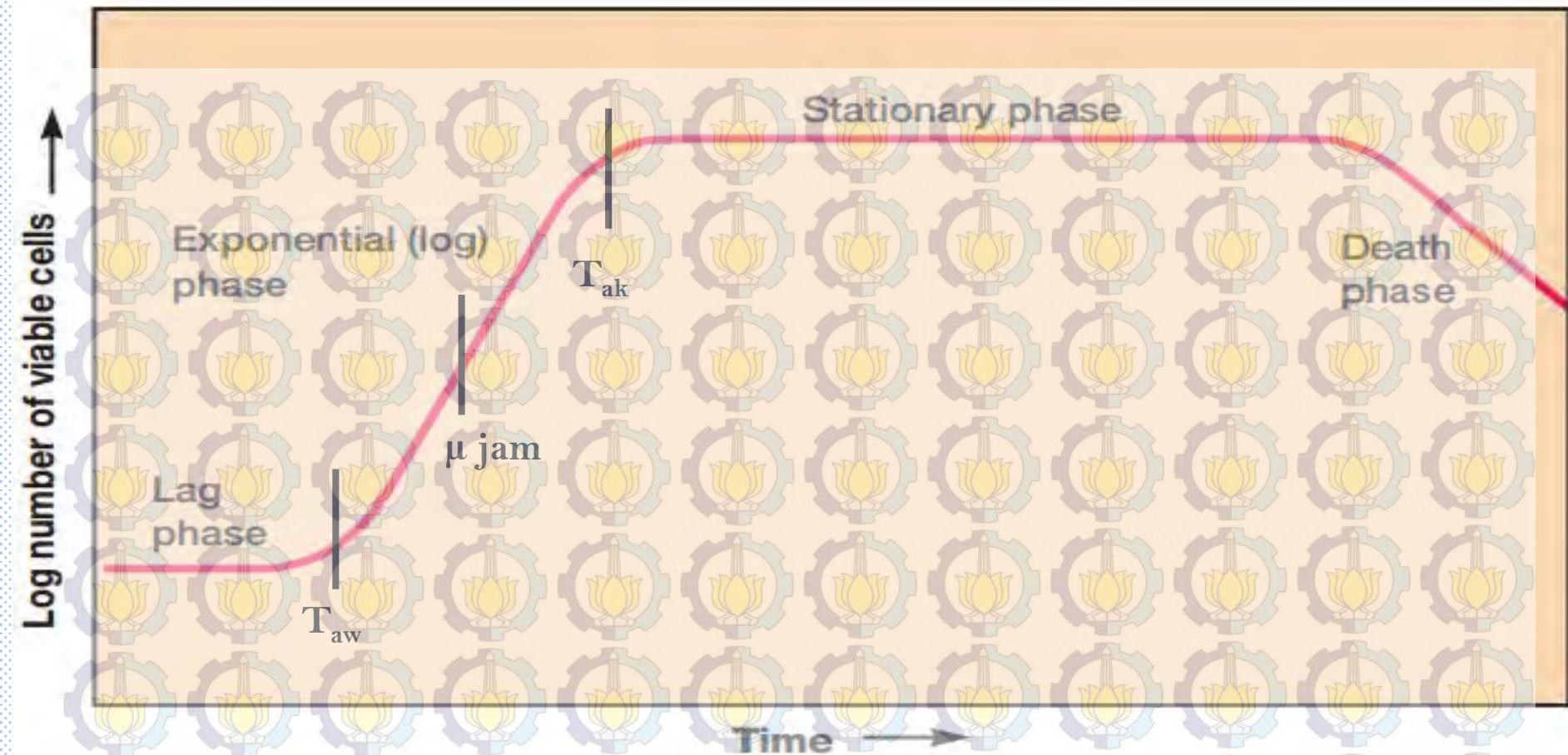




# Penentuan Umur Perlakuan *Bioremoval* Cr ( $\mu$ jam) pada Isolat *Bacillus*







Keterangan:

$\mu$  : umur kultur ketika diperlakukan

a : fase log akhir

b : fase log awal

$$\mu = \frac{a - b}{2}$$

Kurva pertumbuhan dibuat untuk kultur kontrol (tanpa logam) dan kultur dalam medium yang mengandung logam konsentrasi sesuai *range finding test*



# Uji Bioremoval Isolat *Bacillus* spp. Terhadap Logam Cr

Pembuatan Larutan Stok  $K_2Cr_2O_7$

Pembuatan Kultur Starter

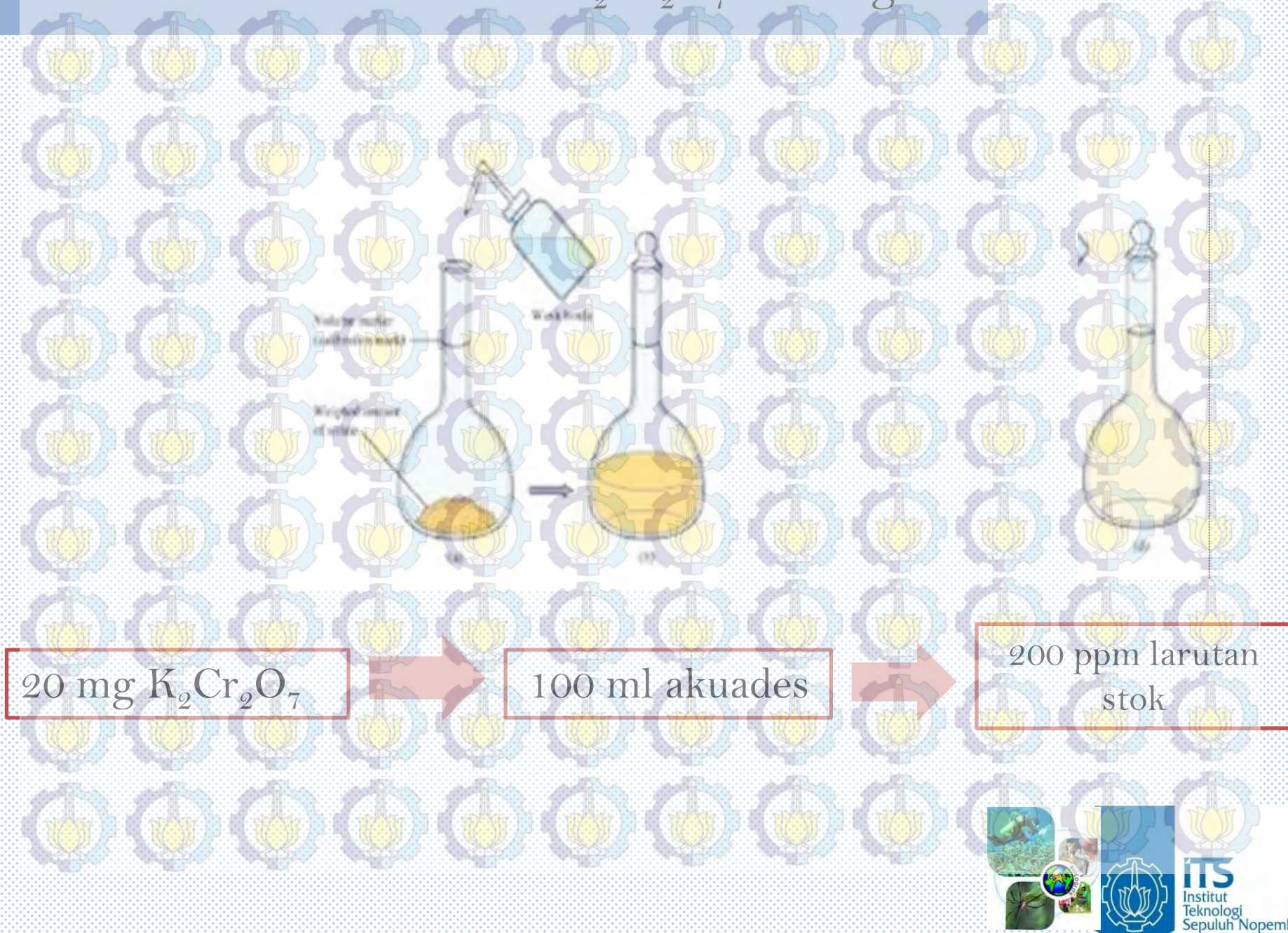
Perlakuan Pemaparan Logam Cr

Pengukuran Konsentrasi Logam Cr yang Diremoval



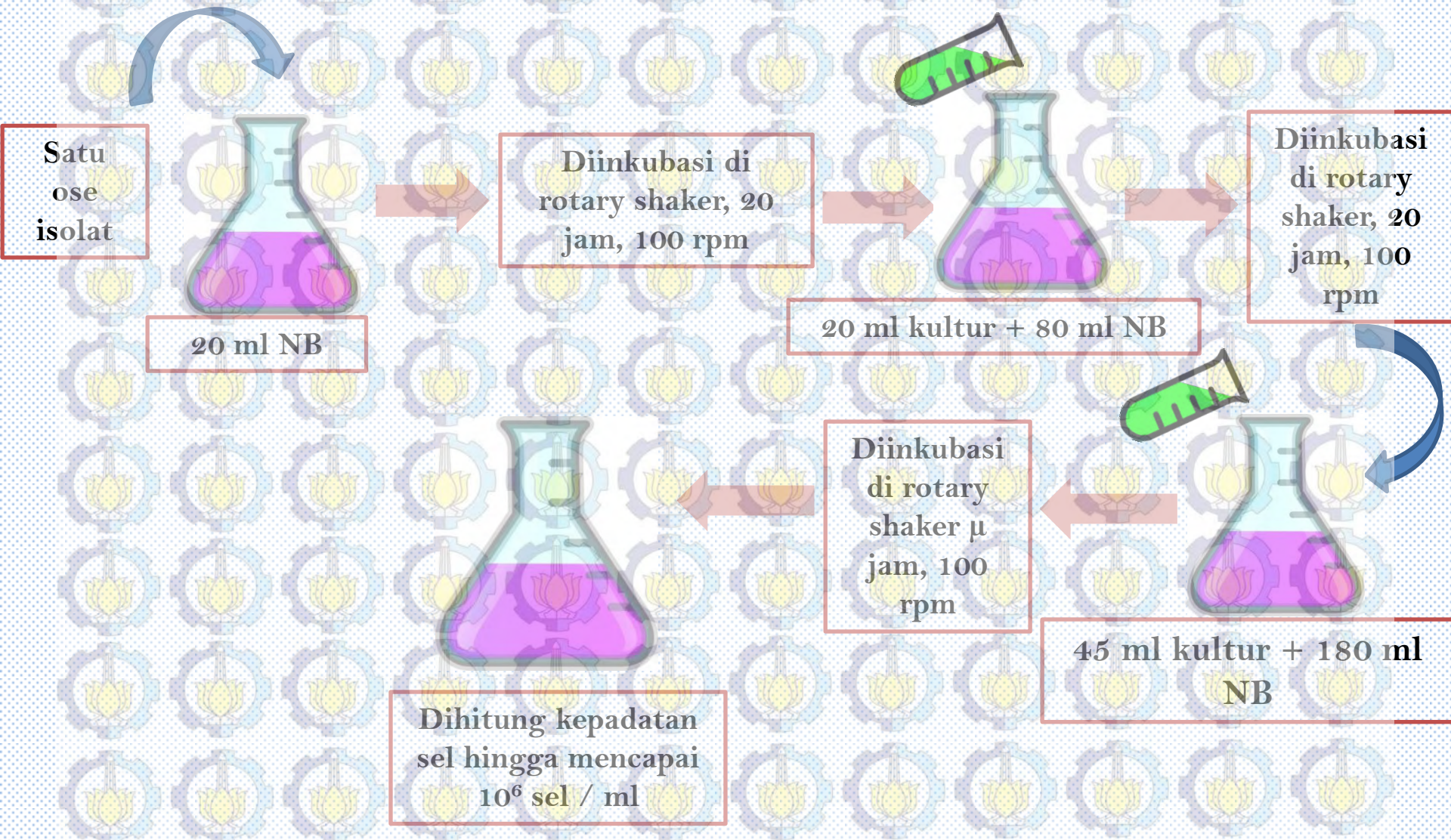


# Pembuatan Larutan Stok $K_2Cr_2O_7$ 200 mg/L



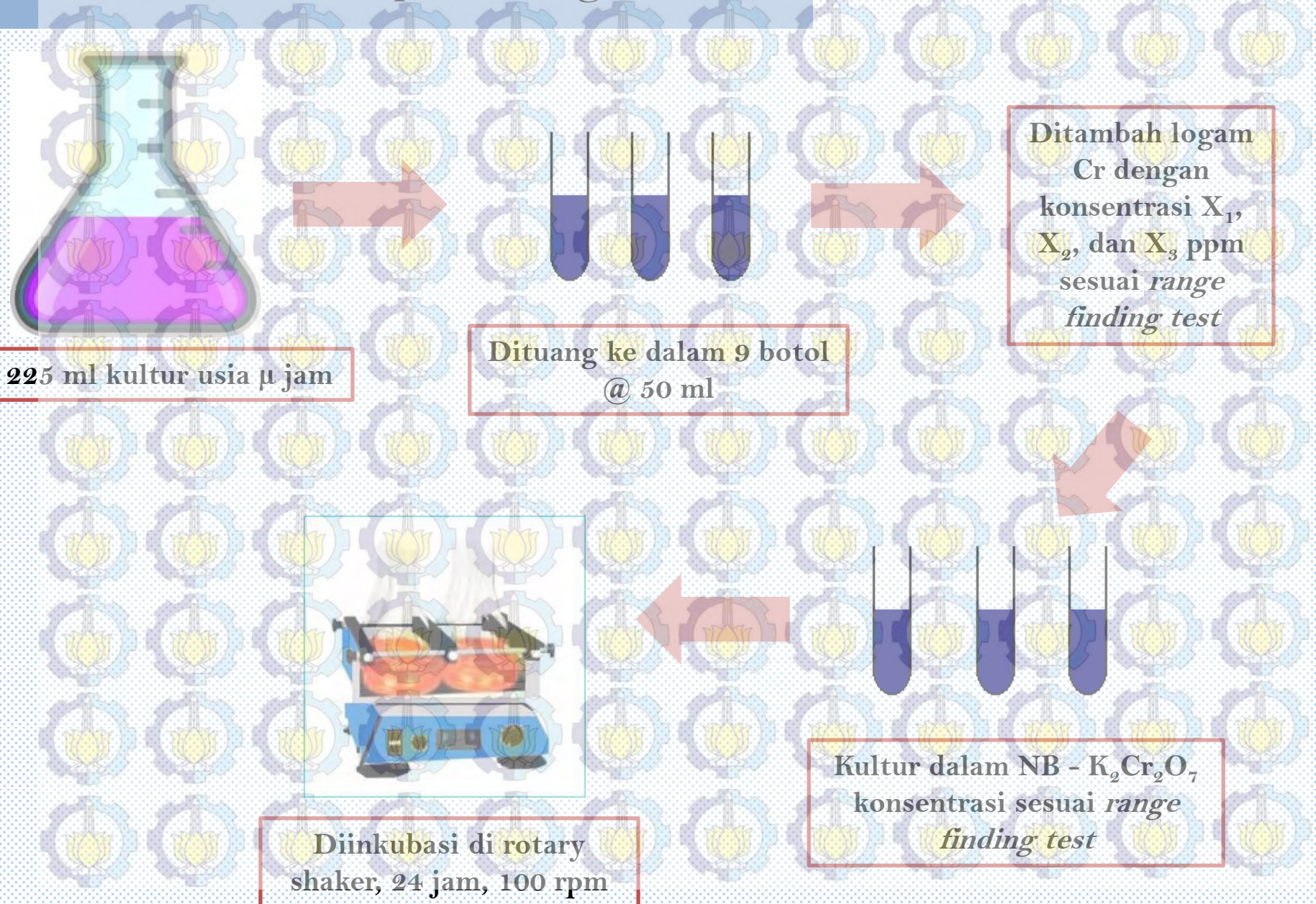


# Pembuatan Kultur Starter





# Perlakuan Pemaparan Logam Cr





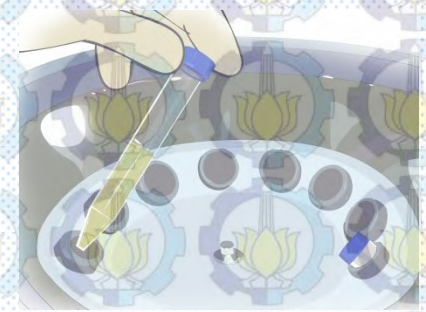
# Pengukuran Konsentrasi Logam Cr yang Diremoval



0,5 ml untuk  
Viabilitas

49,5 ml kultur  
dengan logam Cr

50 ml kultur yang telah  
dipapar logam Cr  
konsentrasi  $X_1$ ,  $X_2$ , dan  
 $X_3$  ppm



Disentrifugasi 4000 rpm,  
20 menit

Dipanaskan pada  
suhu  $\leq 85^\circ\text{C}$  selama  
10 menit

Dimasukkan dalam  
tabung reaksi, ditambah  
10 tetes  $\text{HNO}_3$



Dipisah natant dan  
supernatant

Diukur panjang  
gelombang dengan  
AAS  $\lambda = 357.9 \text{ nm}$





Pengukuran Konsentrasi  
Logam Cr yang Diremoval

Efisiensi *Removal* Logam Cr

$$R = K_0 - K_a$$

$$E = \frac{R}{K_0} \times 100\%$$

R = konsentrasi Cr(VI) yang diremoval;  $K_0$  = konsentrasi awal Cr(VI) dalam medium tanpa inokulum  $K_a$  = konsentrasi akhir Cr(VI) pada filtrat medium setelah dipisah dari *pellet Bacillus*; E = efisiensi removal logam Cr(VI)





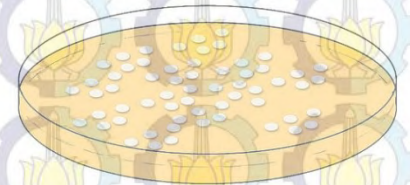
# Uji Viabilitas *Bacillus* spp.



100  $\mu$ l kultur yang telah dipapar logam Cr

Dituang di cawan Petri dan dituang NA tanpa logam

Dicampur dengan gerakan sirkuler membentuk angka 8



Viabilitas ditentukan dari metode CFU (*colony forming unit*).  
Jika koloni yang tumbuh  $>300$  maka dilakukan pengenceran  
hingga didapat koloni yang tumbuh antara 30 – 300 CFU

Diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang



# Analisis Data

Metode  
Kualitatif

Uji  
Resistensi

Uji  
Viabilitas

Metode  
Kuantitatif

Uji  
Bioremoval  
Logam Cr

Analisis data dengan **ANOVA**  
(Analysis of Variance)  
dengan  $\alpha = 5\%$  → jika  
ada perbedaan dilanjutkan  
dengan uji beda nyata  
terkecil (BNT)





# HASIL DAN PEMBAHASAN



# Uji Rekonfirmasi Isolat *Bacillus*

Bergey's Manual Determinative  
Bacteriology (Holt *et al.*, 1994)

Karakter Kunci <i>Bacillus</i> *	Isolat				
	A6	DA11	S1	S6	SS19
Berbentuk basil	+	+	+	+	+
Gram positif	+	+	+	+	+
Endospora	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+
Aerob-Fakultatif Anaerob	+	+	+	+	+
Motil	+	+	+	+	+
Kemoorganotrof	+	+	+	+	+





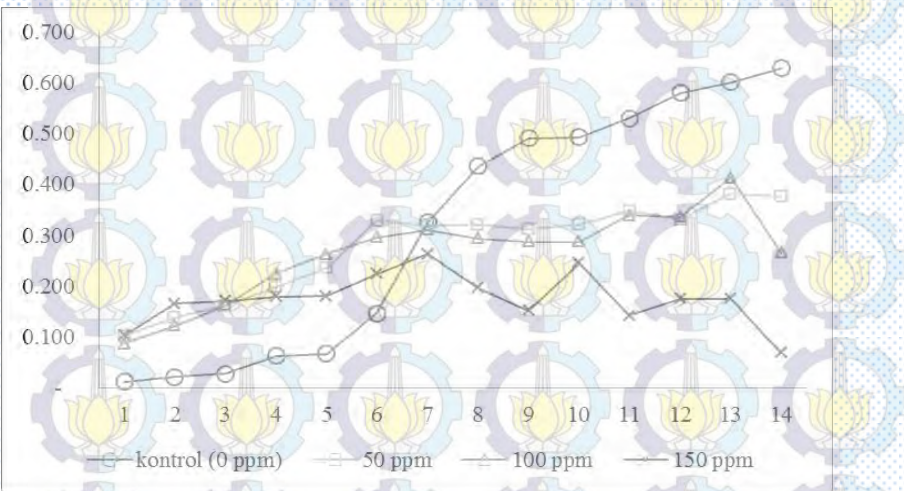
# Resistensi dan *Range Finding Test* Isolat *Bacillus* Terhadap Logam Cr

Isolat <i>Bacillus</i>	Pertumbuhan isolat <i>Bacillus</i> pada medium yang mengandung $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)							
	0.1	50	100	150	200	250	300	
A6	+++	+++	+++	++	++	+	+	
DA11	+++	+++	+++	++	++	++	++	
S1	+++	+++	+++	++	++	++	++	
S6	+++	+++	+++	++	++	+	+	
SS19	+++	+++	+++	++	++	++	++	
<i>B. cereus</i>	+++	+++	+++	++	++	++	++	

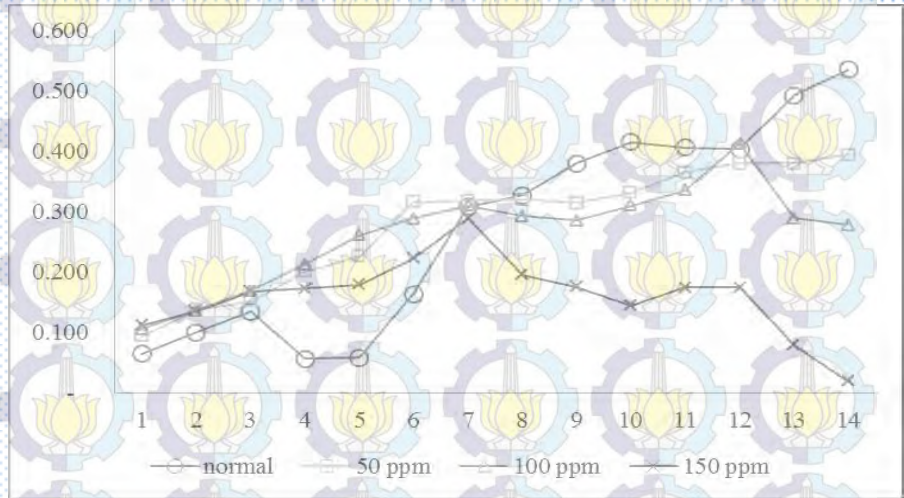
Keterangan: +++ (baik), ++ (cukup baik), + (kurang baik)



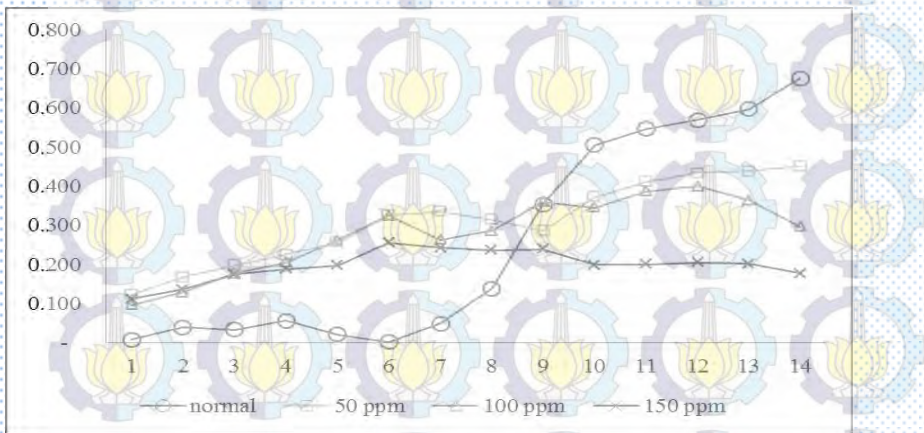
# Viabilitas Isolat *Bacillus* yang Tercekam Logam Cr



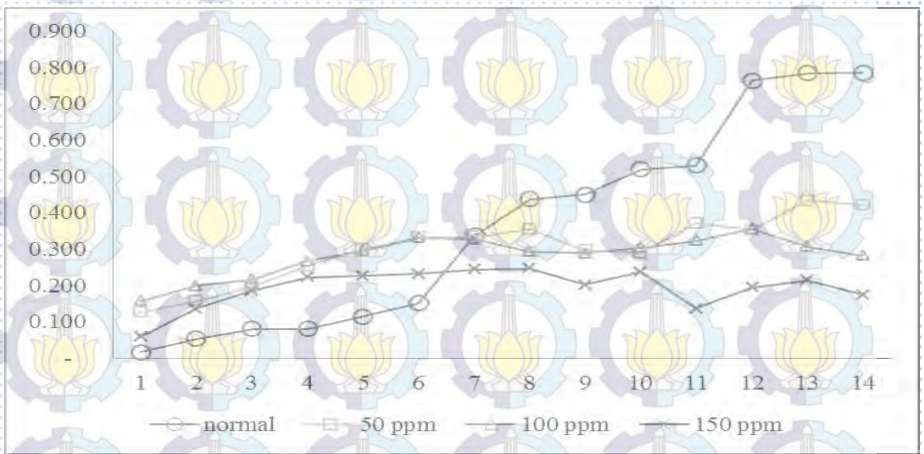
Kurva Pertumbuhan *Bacillus S1*



Kurva Pertumbuhan *Bacillus SS19*



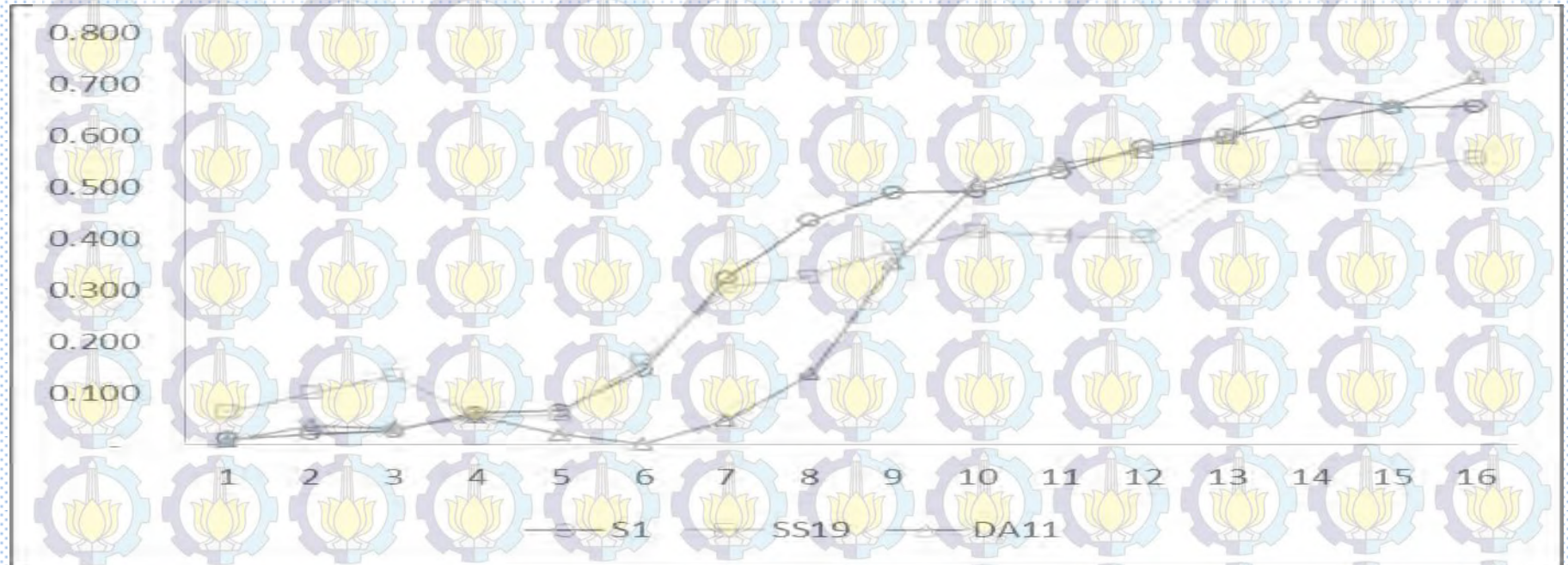
Kurva Pertumbuhan *Bacillus DA11*



Kurva Pertumbuhan *Bacillus cereus*



# Penentuan Umur Perlakuan ( $\mu$ jam) Isolat *Bacillus* untuk *Bioremoval*



$$\mu \text{ jam} = \frac{\text{fase eksponensial akhir} - \text{fase eksponensial awal}}{2} + \text{fase eksponensial awal} = \frac{18-6}{2} + 6 = 6 + 6 = 12$$

Jadi, umur perlakuan *bioremoval* isolat *Bacillus* adalah 12 jam.



# Uji *Bioremoval* Logam Cr

Konsentrasi Perlakuan  
(mg/L)

100

150

Konsentrasi Terukur  
AAS\*

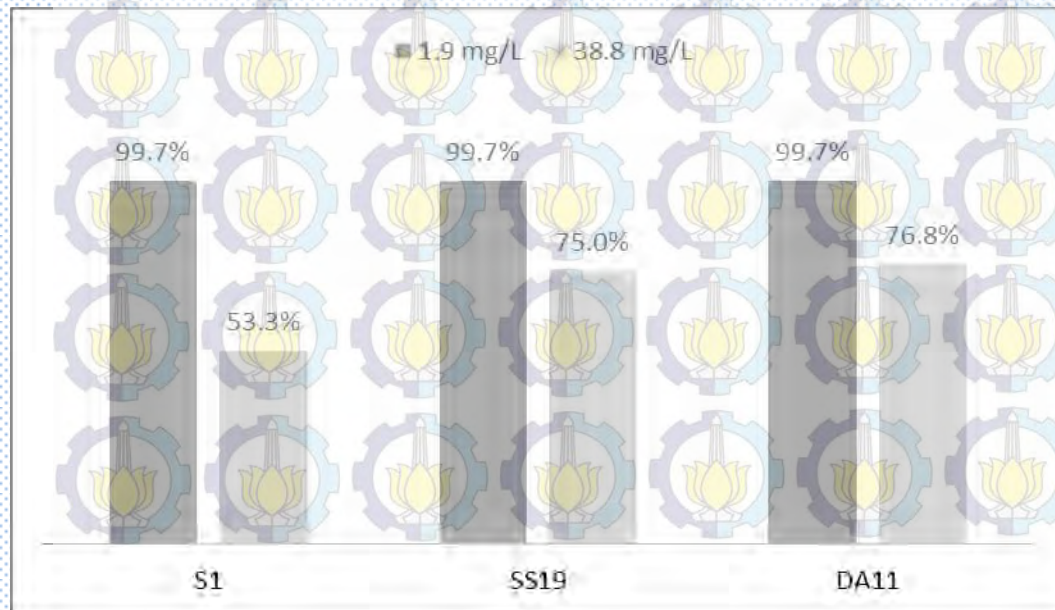
1.9

38.8

\*Sumber: Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi Baristand Industri Surabaya



Isolat	Konsentrasi awal (mg/L)	Konsentrasi yang Tersisa (mg/L)	Konsentrasi yang Diremoval (mg/L)	Efisiensi removal (%)
S1	1.9	0.0051	1.89	99.7
	38.8	18.1	20.70	53.3
SS19	1.9	0.0051	1.89	99.7
	38.8	9.7	29.10	75.0
DA11	1.9	0.0051	1.89	99.7
	38.8	9.0	29.80	76.8



Konsentrasi berpengaruh signifikan terhadap persentase efisiensi *bioremoval*

Jenis isolat tidak berpengaruh signifikan terhadap persentase efisiensi *bioremoval*



# Uji Viabilitas *Bacillus*

Isolat

Konsentrasi Cr yang dipaparkan (mg/L)

50

100

150

S1

219 CFU

148 CFU

Tidak ada  
pertumbuhan

SS19

>300 CFU

>300 CFU

Tidak ada  
pertumbuhan

DA11

>300 CFU

54 CFU

39 CFU







# KESIMPULAN

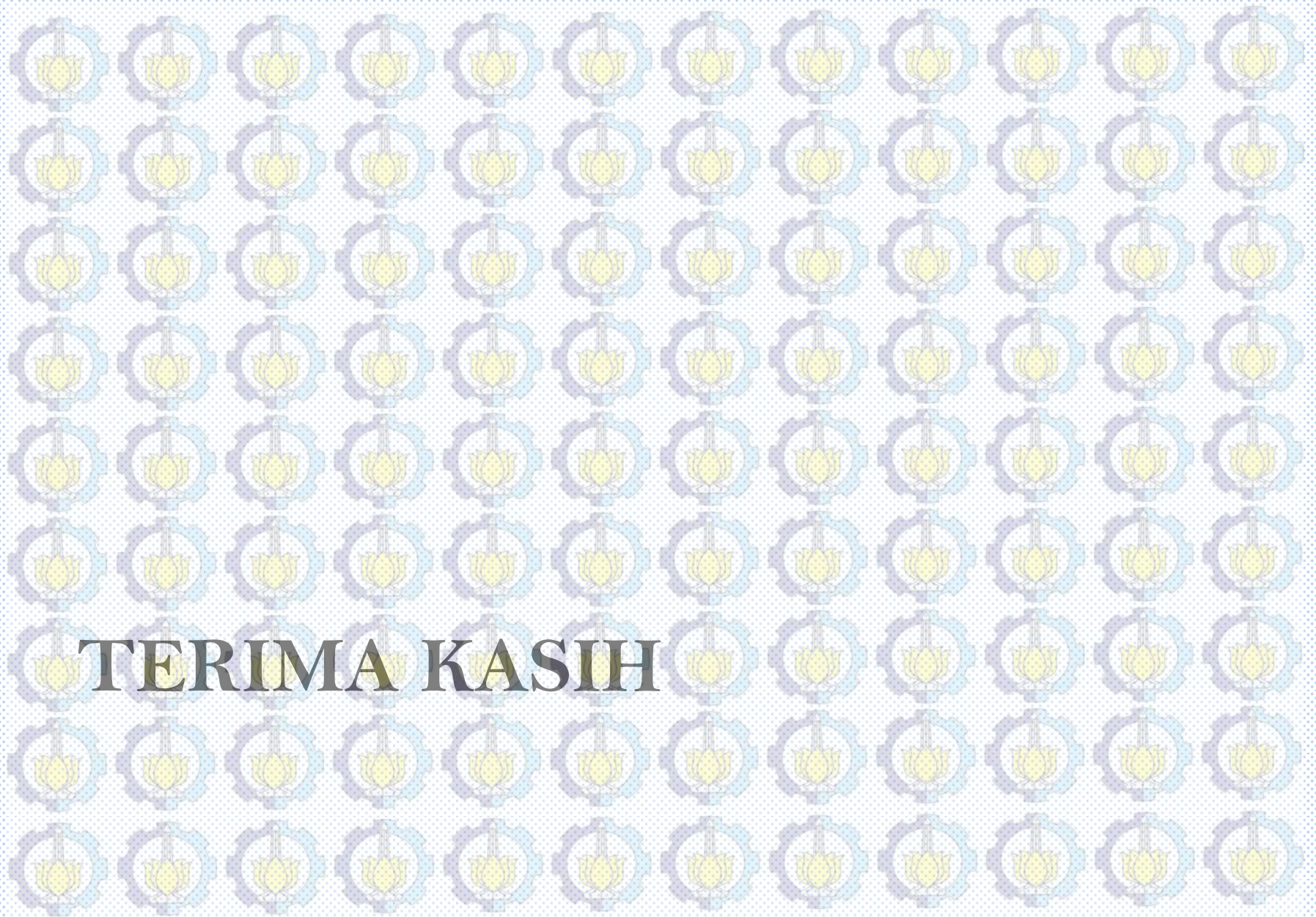


Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat ditarik kesimpulan bahwa:

- Semua isolat *Bacillus* yang digunakan dalam penelitian resisten terhadap logam Cr pada konsentrasi  $\leq 38.8$  mg/L, dengan respon pertumbuhan koloni yang berbeda-beda tiap isolat
- Isolat *Bacillus* DA11 memiliki potensi *bioremoval* lebih tinggi dibanding isolat lain, yaitu sebesar 99.7% dari konsentrasi awal 1.9 mg/L dan 76.8% dari konsentrasi awal 38.8 mg/L







TERIMA KASIH